



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE  
Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

Tesi di Laurea in Genetica Forense

INDAGINE SUL POSSIBILE IMPIEGO DI TESSUTI  
CEREBRALI AUTOPTICI PER ANALISI MOLECOLARI

INVESTIGATION ABOUT POSSIBLE USE OF AUTOPTIC BRAIN TISSUES  
FOR MOLECULAR ANALYSES

Relatore:

Prof. Mauro Pesaresi

Correlatori:

Prof. Paolo Fattorini

Prof.ssa Serena Bonin

Tesi di Laurea Magistrale di:

Serena Nicoletta

Anno Accademico 2021/2022

## *Indice*

### ***Capitolo primo – Introduzione***

*1.1 Il trauma cranico*

*1.2 Anatomia patologica*

*1.3 Fisiopatologia*

*1.4 Sintomatologia*

*1.5 Diagnosi*

*1.6 Biomarkers*

*1.7. mRNA*

*1.8 Tessuti d'archivio*

*1.9 Degradazione dell'RNA che interessa l'analisi dei campioni FFPE*  
*1.10 L'uso dei biomarcatori in medicina forense*

### ***Capitolo secondo – Scopo della tesi***

### ***Capitolo terzo – Materiali e Metodi***

*3.1 Casistica in esame*

*3.2 Taglio al Microtomo*

*3.3 Estrazione di RNA da tessuto FFPE*

*3.4 Quantificazione con Nanodrop*

*3.5 Agilent RNA 6000 Nano Kit*

*3.6 Paraffin-embedded RNA metric (PERM)*

*3.7 Sintesi cDNA da RNA ottenuto da tessuti FFPE*

*3.8 Selezione geni e primers*

*3.9 Real time PCR***Capitolo Quarto - Risultati e discussione**

*4.1 Concentrazione degli estratti*

*4.2 Metrica RIN (RNA INTEGRITY NUMBER)*

*4.3 Metrica PERM*

*4.4 Analisi dei frammenti*

*4.5 Real Time PCR*

**Capitolo Quinto - Conclusioni**

# CAPITOLO PRIMO

## Introduzione

### *1.1 Il trauma cranico*

Il trauma cranico consiste in un danno fisico del tessuto cerebrale che compromette la funzione cerebrale temporaneamente o permanentemente. La diagnosi viene sospettata clinicamente ed è confermata dalle immagini radiologiche (soprattutto TC). Il trattamento iniziale consiste nell'assicurare la pervietà delle vie aeree e il mantenimento di una ventilazione, un'ossigenazione e una pressione arteriosa adeguate. La chirurgia è spesso necessaria in pazienti con lesioni più gravi per monitorare e trattare l'elevazione della pressione endocranica, decomprimere il cervello se la pressione endocranica è aumentata, o rimuovere gli ematomi endocranici. Nei primi giorni dopo la lesione, sono importanti il mantenimento di un'adeguata perfusione e ossigenazione cerebrale e la prevenzione delle complicanze del sensorio alterato. In seguito, molti pazienti necessitano di una riabilitazione. La lesione cerebrale traumatica è una frequente causa di morte e disabilità.

Le cause della lesione cerebrale traumatica comprendono:

- Cadute (specialmente negli anziani e nei bambini piccoli);
- Incidenti automobilistici e altri incidenti correlati ai trasporti (p. es., incidenti con biciclette, investimenti di pedoni);
- Aggressioni;

- Attività sportive (p. es., commozione cerebrale correlata allo sport);

### ***1.2 Anatomia patologica***

Le modificazioni strutturali derivanti da trauma cranico possono essere macroscopiche o microscopiche, a seconda del meccanismo e delle forze coinvolte. I pazienti con traumi meno gravi possono non avere lesioni strutturali macroscopiche. Le manifestazioni cliniche variano notevolmente per gravità e conseguenze. Le lesioni sono in genere classificate come aperte o chiuse. I traumi cranici aperti comportano la penetrazione del cuoio capelluto e del cranio (e solitamente delle meningi e del tessuto cerebrale sottostante). Sono caratteristicamente dovute a proiettili o a oggetti appuntiti, ma vengono considerate traumi cranici aperti anche le fratture del cranio con lacerazioni dei tessuti sovrastanti dovute all'azione di importanti forze smusse. I traumi cranici chiusi si verificano tipicamente quando la testa viene colpita, colpisce un oggetto o è scossa violentemente, causando rapide accelerazioni e decelerazioni del cervello. Le accelerazioni e decelerazioni possono danneggiare i tessuti nel punto di impatto (colpo), al polo opposto (contraccolpo) o diffusamente; i lobi frontali e temporali sono particolarmente vulnerabili a questo tipo di lesione. Gli assoni, i vasi sanguigni o entrambe le strutture possono essere lesionate o lacerate con conseguente danno assonale diffuso. Possono verificarsi perdite ematiche dai vasi danneggiati che causano contusioni, emorragia intracerebrale o subaracnoidea, ed ematomi epidurali o subdurali.

Patologia	Reperti clinici	Diagnosi
Ematoma subdurale acuto	<p>Tipicamente, disfunzione neurologica acuta, che può essere focale, diffusa, o entrambe le cose.</p> <p>Con piccoli ematomi, funzione normale possibile</p>	<p><b>TC:</b> iperdensità nello spazio subdurale, classicamente a forma di mezzaluna.</p> <p>Importante grado di spostamento della linea mediana</p>
Frattura della base cranica	<p>Perdita di liquido cerebrospinale dal naso o dall'orecchio</p> <p>Sangue dietro la membrana timpanica (emotimpano) o nell'orecchio esterno</p> <p>Ecchimosi dietro l'orecchio (segno di Battle) o intorno all'occhio (occhi di procione)</p>	<p><b>TC:</b> in genere visibile</p>
Contusione cerebrale	<p>Gradi ampiamente variabili di disfunzione neurologica o funzione normale</p>	<p><b>TC:</b> iperdensità derivanti da emorragie puntiformi di varie dimensioni</p>
Commozione cerebrale	<p>Transitoria alterazione dello stato mentale (p. es., perdita di coscienza o di memoria) della durata &lt; 6 h</p>	<p>La diagnosi si basa sui quadri clinici</p> <p><b>TC:</b> raramente anormale</p>
Ematoma subdurale cronico	<p>Graduale cefalea, sonnolenza, confusione, a volte con deficit focali o crisi epilettiche</p>	<p><b>TC:</b> ipodensità nello spazio subdurale (l'alterazione di segnale è isodensa durante il passaggio nella fase subacuta da iperdensa a ipodensa)</p>

Patologia	Reperti clinici	Diagnosi
Danno assonale diffuso	Perdita di coscienza di durata > 6 h, ma nessun deficit focale o posture motorie	<p>La diagnosi si basa sui quadri clinici</p> <p><b>TC:</b> in un primo momento, può essere normale o mostrare piccole iperdensità (microemorragie) nel corpo calloso, nel centro semiovale, nei gangli della base, o nel tronco encefalico</p> <p><b>RM:</b> microemorragie multiple di piccole dimensioni nella sostanza bianca profonda o nelle aree sottocorticali e nel tronco cerebrale</p>
Ematoma epidurale	<p>Cefalea, perdita di coscienza entro ore, a volte con un intervallo di lucidità</p> <p>Erniazione che causa tipicamente emiparesi controlaterale e dilatazione pupillare ipsilaterale</p>	<p><b>TC:</b> iperdensità nello spazio epidurale, classicamente a forma lenticolare e localizzata sopra l'arteria meningea media (fossa temporale) dovuta a una frattura dell'osso temporale</p>
Emorragia subaracnoidea	<p>In genere, funzione normale</p> <p>Occasionalmente, disfunzione neurologica acuta</p>	<p><b>TC:</b> iperdensità nello spazio subaracnoideo sulla superficie del cervello; spesso delineando i solchi</p>

[https://www.msmanuals.com/it/professionale/traumi-avvelenamento/trauma-cranico/trauma-cranico#v1111428\\_it](https://www.msmanuals.com/it/professionale/traumi-avvelenamento/trauma-cranico/trauma-cranico#v1111428_it)

### ***1.2.1 Commozione cerebrale***

La commozione cerebrale è definita come un'alterazione post-traumatica dello stato mentale, transitoria e reversibile (p. es., perdita di coscienza o di memoria, confusione) che dura da qualche secondo fino ad alcuni minuti e, per definizione, < 6 h. Lesioni cerebrali strutturali macroscopiche e gravi postumi neurologici non fanno parte della commozione cerebrale, sebbene una disabilità temporanea possa risultare dai sintomi (come nausea, cefalea, vertigini, disturbi della memoria e difficoltà nella concentrazione [sindrome postcommotiva]), i quali solitamente si risolvono entro qualche settimana. Tuttavia, si ritiene che le commozioni multiple possano portare a encefalopatia traumatica cronica, come risulta in una grave disfunzione cerebrale.

### ***1.2.2 Contusioni cerebrali***

Le contusioni (ecchimosi del cervello) possono comparire a seguito di traumi aperti o chiusi e possono compromettere un'ampia gamma di funzioni cerebrali, in base alla loro grandezza e localizzazione. Le contusioni più grandi possono causare edema cerebrale e aumento della pressione intracranica. Le contusioni possono ingrandirsi nelle ore e nei giorni successivi alla lesione iniziale e causare deterioramento neurologico; può essere necessario l'intervento chirurgico.

### ***1.2.3 Danno assonale diffuso***

Il danno assonale diffuso si verifica quando la decelerazione rotazionale produce forze di taglio che causano una distruzione generalizzata e diffusa delle



fibre degli assoni e della guaina mielinica. Solo poche lesioni di danno assonale diffuso possono derivare da traumi cranici minori. Nel danno assonale diffuso non sono presenti lesioni strutturali massive, ma spesso si osservano piccole emorragie petecchiali nella sostanza bianca alla TC e all'esame istopatologico. Il danno assonale diffuso viene talvolta definito clinicamente come una perdita di coscienza di durata  $> 6$  h in assenza di una specifica lesione focale. L'edema derivante dal trauma spesso provoca un aumento della pressione intracranica, causando varie manifestazioni. Il danno assonale diffuso è tipicamente la lesione che sta alla base della sindrome del bimbo maltrattato.

#### ***1.2.4 Ematomi***

Gli ematomi (raccolte di sangue all'interno o intorno al cervello) si possono verificare a seguito di traumi aperti o chiusi e possono essere epidurali, subdurali o intracerebrali. L'emorragia subaracnoidea (sanguinamento nello spazio subaracnoideo) è frequente nel trauma cranico, sebbene l'aspetto alla TC non sia generalmente lo stesso dell'emorragia subaracnoidea da rottura di un aneurisma cerebrale. Gli ematomi subdurali sono raccolte ematiche tra la dura madre e la madre/aracnoide. Gli ematomi subdurali acuti derivano dalla lacerazione delle vene corticali o dalla rottura delle vene a ponte tra la corteccia e dei seni durali. Ematomi subdurali acuti si verificano spesso nei pazienti con:

- Traumi cranici causati da cadute o incidenti stradali;
- Contusioni cerebrali sottostanti;
- Un ematoma epidurale controlaterale;

La compressione del cervello da parte l'ematoma e il rigonfiamento del cervello a causa dell'edema o dell'iperemia (aumento del flusso sanguigno a seguito dell'ingorgo dei vasi) possono aumentare la pressione intracranica. Quando si verificano sia compressione che gonfiore, la mortalità e la morbilità possono essere alte. Un ematoma subdurale cronico può verificarsi e causare sintomi ingravescenti nell'arco di varie settimane dopo il trauma. Gli ematomi subdurali cronici si verificano di più negli alcolisti e nei pazienti anziani (soprattutto in quelli che assumono farmaci antiaggreganti o anticoagulanti o in quelli con atrofia cerebrale). I pazienti anziani possono considerare il trauma cranico relativamente banale o possono averlo anche dimenticato. Contrariamente all'ematoma subdurale acuto, l'edema e l'aumento della pressione intracranica non sono tipici. Gli ematomi epidurali sono raccolti ematici tra la teca cranica e la dura madre e sono meno frequenti degli ematomi subdurali. Gli ematomi epidurali, che sono di grandi dimensioni o si espandono rapidamente, sono in genere causati da un sanguinamento arterioso, classicamente dovuto a lesione dell'arteria meningea media a seguito di una frattura dell'osso temporale. Senza intervento, i pazienti con ematomi epidurali possono peggiorare rapidamente e morire. Gli ematomi epidurali piccoli e venosi sono raramente mortali. Gli ematomi intracerebrali sono raccolti ematici all'interno del parenchima cerebrale. Nell'origine traumatica, essi risultano dalla fusione di contusioni. Esattamente quando una o più contusioni diventano ematoma non è ben definito. L'aumento della pressione intracranica, l'erniazione e la compressione del tronco encefalico possono svilupparsi successivamente, specialmente in presenza di lesioni nei lobi temporali.

### ***1.2.5 Fratture craniche***

Le lesioni penetranti per definizione comprendono le fratture. I traumi cranici chiusi possono anche causare fratture craniche, che possono essere lineari, depresse o comminute. La presenza di una frattura suggerisce che una forza significativa è stata coinvolta nel trauma. La maggior parte dei pazienti con fratture lineari semplici e assenza di compromissione neurologica non è a rischio elevato di danni encefalici, ma pazienti con qualsiasi frattura associata a compromissione neurologica sono a rischio aumentato di ematomi intracranici. Le fratture del cranio che comportano rischi particolari sono:

- Fratture depresse: queste fratture hanno un rischio più elevato di lesionare la dura, di danneggiare il cervello sottostante o di provocare entrambe le cose.
- Fratture dell'osso temporale che intersecano l'area dove decorre l'arteria meningea media: in queste fratture, un ematoma epidurale è un rischio.
- Fratture che intersecano uno dei seni durali principali: queste fratture possono causare un'emorragia significativa ed ematomi venosi epidurali o subdurali. I seni venosi danneggiati possono successivamente trombizzarsi e causare un infarto cerebrale.
- Fratture che coinvolgono il canale carotideo: queste fratture possono provocare dissezione dell'arteria carotide.
- Fratture dell'osso occipitale e della base del cranio (ossa della base cranica): queste ossa sono spesse e dure; pertanto, fratture in queste aree indicano un impatto di alta intensità e aumentano notevolmente il rischio di lesioni cerebrali. Le fratture della base cranica che si estendono alla parte petrosa dell'osso temporale spesso danneggiano le strutture dell'orecchio medio e

interno e possono compromettere la funzione dei nervi facciale, acustico e vestibolare.

- Fratture nei lattanti: le meningi possono rimanere intrappolate in una frattura cranica lineare con successivo sviluppo di una cisti leptomeningea ed espansione della frattura originale (fratture da accrescimento).

### ***1.3 Fisiopatologia***

La funzione cerebrale può essere compromessa dal danno diretto (p. es., schiacciamento, lacerazione) del tessuto cerebrale. Un ulteriore danno si può verificare poco dopo a causa della cascata di eventi scatenata dalla lesione iniziale. Il trauma cranico di qualsiasi tipo può causare edema cerebrale e diminuzione del flusso ematico cerebrale. La volta cranica ha dimensioni fisse (definite dalle ossa del cranio) e contiene il liquido cerebrospinale non compressibile e il tessuto cerebrale poco compressibile; di conseguenza, il rigonfiamento cerebrale per edema o un ematoma endocranico non hanno la possibilità di espandersi e pertanto causano un aumento della pressione intracranica. Il flusso ematico cerebrale è proporzionale alla pressione di perfusione cerebrale, che rappresenta la differenza tra la pressione arteriosa media e la pressione intracranica media. Così, con l'aumentare della pressione intracranica (o la diminuzione della pressione arteriosa media), la pressione di perfusione cerebrale diminuisce. Quando la pressione di perfusione cerebrale scende al di sotto di 50 mmHg, il cervello può diventare ischemico. L'ischemia e l'edema possono innescare vari meccanismi secondari di danno (p. es., il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori, calcio intracellulare, radicali liberi e citochine), causando ulteriori danni cellulari, edema e incremento della pressione intracranica. Le complicanze sistemiche del trauma (p. es.,

ipotensione, ipossia) possono anche contribuire all'ischemia cerebrale e sono spesso definite lesioni cerebrali secondarie. Una pressione intracranica eccessiva causa inizialmente una disfunzione cerebrale globale. Se l'eccessiva pressione intracranica non viene risolta, può spingere il tessuto cerebrale attraverso il tentorio o attraverso il foro occipitale, causando un'ernia cerebrale (e un aumento di morbilità e mortalità). Se la pressione intracranica aumenta fino a eguagliare la pressione arteriosa media, la pressione di perfusione cerebrale diventa nulla, provocando una completa ischemia cerebrale e la morte cerebrale; l'assenza di flusso ematico cerebrale è un'evidenza obiettiva di morte cerebrale. L'iperemia e l'aumento del flusso ematico cerebrale può derivare da lesioni commotive negli adolescenti o nei bambini. La sindrome da secondo impatto è un'entità rara e dibattuta, definita come improvviso aumento della pressione intracranica e talvolta morte dopo un secondo insulto traumatico che si verifica prima del completo recupero da un precedente trauma cranico minore. È attribuita alla perdita di autoregolazione del flusso ematico cerebrale che porta a congestione vascolare, aumento di pressione intracranica ed ernia.

#### ***1.4 Sintomatologia***

Inizialmente, la maggior parte dei pazienti con lesione cerebrale traumatica moderata o grave perde coscienza (generalmente per secondi o minuti), anche se alcuni pazienti con trauma cranico minore hanno solo confusione o amnesia (l'amnesia di solito è retrograda, il che significa la perdita di memoria per un periodo che va da pochi secondi fino ad alcune ore prima del trauma). Il bambino può semplicemente diventare irritabile. Alcuni pazienti hanno convulsioni, spesso entro la prima ora o giornata. Dopo questi sintomi iniziali, i pazienti possono essere completamente svegli e vigili oppure privi di

coscienza e la funzione cerebrale può essere modificata in vario modo, dalla lieve confusione allo stupor e al coma. La durata della perdita di coscienza e la gravità dell'obnubilamento sono approssimativamente proporzionali alla gravità del trauma ma non sono specifiche. La Glasgow Coma Scale (vedi tabella Glasgow coma scale) è un sistema di punteggio rapido e riproducibile, da utilizzare durante la valutazione iniziale per determinare la gravità della lesione cerebrale traumatica. Si basa su apertura degli occhi, risposta verbale, migliore risposta motoria. Il punteggio più basso indica un danno probabilmente letale, specie se entrambe le pupille non rispondono alla luce e le risposte oculovestibolari sono assenti. I punteggi iniziali più alti tendono a predire un miglior recupero. Per convenzione, la gravità del trauma cranico è inizialmente definita dalla Glasgow Coma Scale:

- 14 o 15 è un trauma cranico lieve
- 9-13 è un trauma cranico moderato
- 3-8 è un trauma cranico grave

Area valutata	Risposta	Punti
Apertura degli occhi	Aperti spontaneamente	4
	Aperti a comando verbale	3
	Apertura in risposta all'applicazione di stimoli dolorosi sugli arti o sullo sterno	2
	Assente	1

Area valutata	Risposta	Punti
Verbale	Orientato	5
	Disorientato, ma capace di rispondere alle domande	4
	Risposte inadeguate alle domande; parole distinguibili	3
	Linguaggio incomprensibile	2
	Assente	1
Motorio	Obbedisce ai comandi	6
	Risponde al dolore con movimenti finalizzati	5
	Retrazione da stimoli dolorosi	4
	Risponde al dolore con anomala flessione (postura decorticata)	3
	Risponde al dolore con anomala (rigida) estensione (postura decerebrata)	2
Assente	1	

\*Punteggi totali < 8 sono tipicamente considerati come coma.

<https://www.msdmanuals.com/it/professionale/traumi-avvelenamento/trauma-cranico/trauma-cranico#v1111428> it

Farmaci sedativi e paralizzanti possono diminuire i valori della Glasgow Coma Scale e devono essere evitati prima che sia effettuato un esame neurologico completo.

### ***1.5 Diagnosi***

Un trauma cranico può anche determinare la morte immediatamente, basti pensare al trauma balistico (genericamente anche ferita d'arma da fuoco, in inglese "gunshot wound"). Questo indica una forma di trauma fisico dovuto all'impatto di proiettili come pallottole, pallettoni o pallini sparati da armi da fuoco, o anche, ma raramente mancando la canna, per l'improvviso scoppio di munizioni in depositi o caricatori. Le forme più comuni di trauma balistico derivano dalle armi da fuoco utilizzate in scontri armati sia in tempo di guerra che di pace, all'utilizzo ricreativo di armi sia nella caccia che nel tiro a segno, a tentativi di suicidio o tentativi di omicidio. Esso può risultare fatale, perché potrebbe colpire e ledere in modo serio organi vitali oppure causare un'emorragia che può essere controllata con il laccio emostatico o meno. Può causare ferite o lesioni permanenti e provocare disabilità fisica, temporanea o permanente. La diagnosi consiste in:

- Valutazione rapida iniziale del trauma
- Glasgow Coma Scale ed esame neurologico
- TC



## ***1.6 Biomarkers***

I biomarcatori sono molecole che si trovano nel sangue, nei fluidi corporei o nei tessuti e possono essere un segno di un processo normale o anormale. Una certa molecola per essere considerata un biomarcatore deve soddisfare alcuni criteri specifici. In primo luogo, deve essere facilmente accessibile, quindi il suo rilevamento dovrebbe essere ottenuto con la procedura meno invasiva (ad esempio, campionamento venoso). Occorre poi considerare anche la sua specificità e sensibilità. Inoltre, dovrebbe essere traducibile dalla ricerca alla clinica.

- I biomarcatori possono essere suddivisi in diversi gruppi: Biomarcatori di esposizione che valutano in campioni biologici la presenza di una sostanza chimica esogena.
- I biomarcatori di suscettibilità sono usati per indicare la suscettibilità a una sostanza xenobiotica (anche per il polimorfismo genetico).
- I biomarcatori di effetto evidenziano le variazioni fisiologiche e biochimiche prodotte in un organismo quando esposto a una sostanza chimica esogena o in associazione a una malattia.

I più comuni e di interesse sono i biomarcatori ad effetto che possono evidenziare sia un processo fisiologico che un fenomeno patologico di un organismo. Di solito vengono misurati utilizzando campioni biologici come sangue, in particolare siero, o anche urina. L'importanza della loro individuazione è correlata alla possibilità di una diagnosi precoce, alla valutazione dei diversi trattamenti, alla valutazione della progressione della malattia e alla risposta alla terapia. Alcuni esempi di biomarcatori che vengono generalmente rilevati da esami del sangue o delle urine sono:

- Bilirubina per la funzione epatica.
- Colesterolo per il rischio cardiovascolare.
- Ferro per l'anemia.
- Glucosio per il diabete.
- CEA (antigene carcinoma embrionale) per carcinoma mammario e del colon (Sono et al. 2020).

Trovare un test diagnostico basato su biofluidi per TBI è un'esigenza medica urgente con l'obiettivo di monitorare i pazienti in unità di terapia intensiva o classificare il grado del trauma al pronto soccorso (Zhou et al. 2021). I miRNA e gli mRNA iniziarono ad essere considerati buoni biomarcatori anche per il trauma cranico, per la loro utilità in molte altre patologie. C'è la necessità di individuare modalità ancora più accurate e personalizzate (entrando nell'ottica della medicina personalizzata) per diagnosticare, pronosticare il decorso e le possibili terapie di una malattia. I biomarcatori molecolari personalizzati in futuro avranno un ruolo importante nei disturbi del SNC (Sunde 2010). I miRNA sono i candidati ideali come biomarcatori perfetti perché la loro espressione attraverso l'organismo è stabile, hanno un'elevata specificità e possono essere facilmente rilevati dal sangue, dai fluidi corporei e dai tessuti. Lo svantaggio purtroppo è la mancanza di riproducibilità, motivo per cui i miRNA non vengono ancora utilizzati come biomarcatori ad alta precisione (Condrat et al. 2020). La possibilità di utilizzare i miRNA come biomarcatori è correlata alle loro proprietà e biogenesi perché la relazione tra i miRNA e le proteine Argonaut, che formano il complesso RISC, determina la loro maggiore stabilità alla degradazione rispetto all'mRNA (Silva et al. 2015). C'è anche lo sviluppo di studi sul possibile uso di mRNA come biomarcatori perché è stato scoperto che il 70% dell'RNA totale isolato dal sangue è l'mRNA

dell'emoglobina e condivide più dell'80% del trascrittoma con i tessuti principali (Sunde 2010). Inoltre, l'mRNA può essere considerato un buon biomarcatore perché è associato a molte funzioni all'interno delle cellule come la trascrizione, lo splicing e il trasporto nucleocitoplasmatico. Queste funzioni sono quindi correlate alla risposta allo stress intracellulare, alle vie di segnalazione e al funzionamento del sistema immunitario (DeGracia 2018).

### ***1.7 mRNA***

L'RNA messaggero (mRNA) è una molecola di RNA a filamento singolo complementare alla sequenza dei filamenti di DNA di un gene. È uno dei tipi di RNA presenti nelle cellule e il suo ruolo principale è la trascrizione nelle proteine. In particolare, gli mRNA sono alla base del dogma centrale della biologia che acclama il trasferimento dell'informazione genetica nel DNA ad una molecola di RNA e quindi ad una proteina. Gli mRNA dal nucleo traslocano nel citoplasma dove avviene la trascrizione da parte delle RNA polimerasi e danno origine a quello che viene chiamato trascrittoma, la totalità dell'RNA trascritto a partire da una molecola di DNA. L'mRNA è importante anche perché è espresso in modo differenziale all'interno delle cellule ed è specifico per ogni tipo di cellula e di tessuto. Tuttavia, al momento, l'unico modo per avere il pattern genetico è attraverso una biopsia che rende l'analisi molto complessa e difficile da eseguire.

## ***1.8 Tessuti d'archivio***

I tessuti d'archivio possono essere frammenti di organi prelevati da persone durante le biopsie, una procedura per rimuovere un tessuto da qualsiasi parte del corpo per esaminarlo, o autopsie e quindi fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE). Si chiamano tessuti d'archivio perché si conservano a lungo (anche decenni) in appositi depositi delle UCO di Anatomia Patologica. Questo enorme numero di tessuti rappresenta la più grande raccolta disponibile di campioni umani. La loro importanza è legata alle innumerevoli analisi che è possibile effettuare sia nella ricerca che nelle cliniche grazie alla loro lunga disponibilità. Inoltre, i tessuti FFPE consentono l'analisi su DNA e RNA anche dopo un lungo periodo di tempo perché se il tessuto viene fissato quasi immediatamente dopo l'espanto, la degradazione del DNA e dell'RNA è limitata. Questi tipi di tessuti possono essere utilizzati ad esempio per studiare nuovi biomarcatori per diversi tipi di malattie o per studiare nuovi target terapeutici (Stanta 2011). Si ritiene che i tessuti d'archivio in futuro saranno la prima fonte di analisi nella ricerca. Soprattutto, i tessuti d'archivio prelevati dall'autopsia sono una risorsa illimitata di campioni.

## ***1.9 Degradazione dell'RNA in campioni FFPE***

L'RNA più del DNA è incline alla degradazione a causa sia di fattori esogeni che endogeni. L'RNA è più suscettibile all'idrolisi dei legami fosfodiesterici; infatti, la struttura chimica intrinseca della molecola di RNA (in particolare il -OH sulla C2 dello zucchero) gioca un ruolo centrale nella degradazione non enzimatica di questo acido nucleico (Fattorini et al. 2020). Trattandosi di tessuti d'archivio, è importante sottolineare che anche la morte di un organismo

contribuisce alla morte cellulare e all'autolisi. Ciò si riflette sui trascrittomi tissutali che sono correlati alla degradazione dell'mRNA nel post mortem (Ferreira et al. 2018). Un fattore importante è l'intervallo post mortem (PMI) che è il tempo che intercorre tra la morte di una persona e il ritrovamento della medesima. Determinare il PMI è significativo per indagare sulla possibile causa della morte e su altre ipotesi del reato. Dopo che la morte è sopraggiunta, un corpo raggiungerà la decomposizione, che è un processo continuo influenzato da molteplici fattori. L'elemento più comune che contribuisce alla biodegradazione di un corpo è l'ambiente come le regioni geografiche, l'umidità, la temperatura, gli insetti. Inoltre, anche il peso corporeo e l'abbigliamento possono influenzare il processo. Tuttavia, per preservare un corpo e il suo DNA o RNA, dovrebbe essere mantenuto alla corretta temperatura (4°C o meno) perché a temperature più alte i processi degradativi sono più rapidi. In linea di massima, più alta è la temperatura, prima il corpo

va in degradazione (Gelderman et al. 2018).

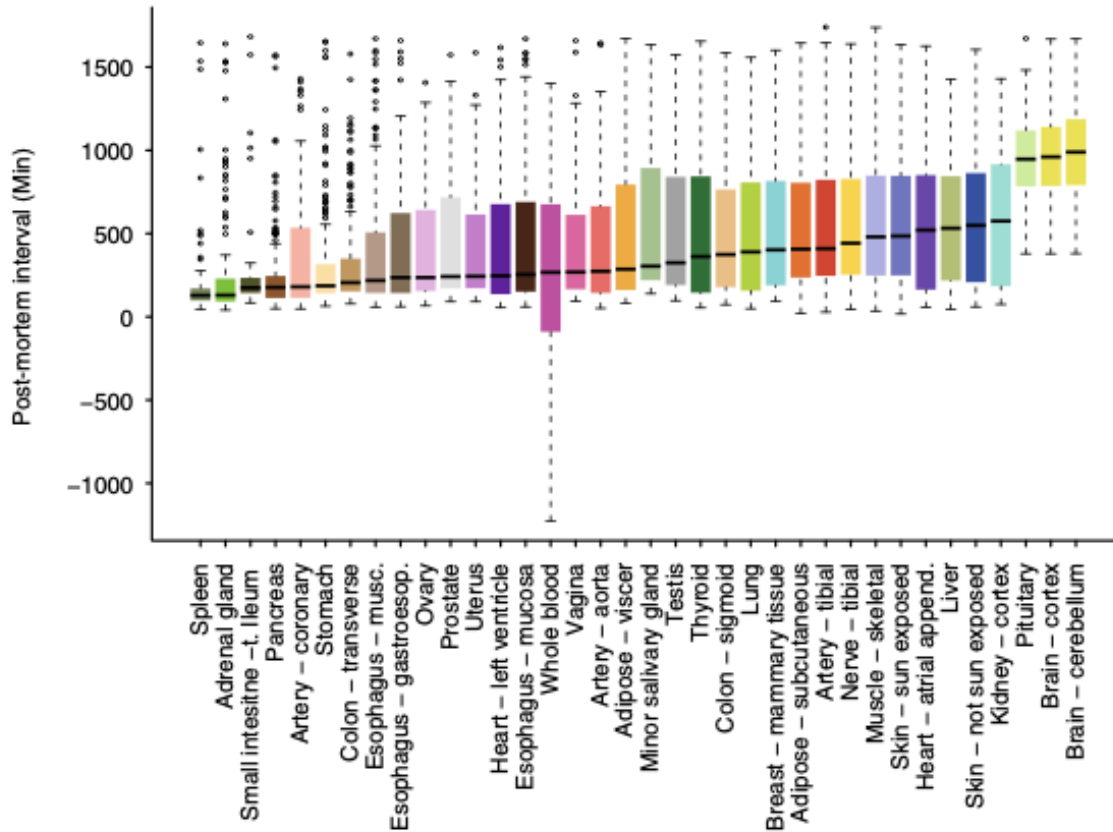


Figure 1. Modificazione del pattern di espressione nei vari tessuti (asse x). Asse y: PMI (in minuti). Figura tratta da Ferreira et al (2018).

Quindi, la degradazione dell'RNA, come detto, è aumentata da un intervallo PMI più alto. Motivo per cui un corpo dovrebbe essere tenuto in una temperatura refrigerata e l'autopsia dovrebbe essere eseguita il prima possibile. Se sono necessari tessuti d'archivio per la ricerca, l'autopsia deve essere eseguita dopo un massimo di 48 ore. Altri fattori che portano al danneggiamento dell'RNA sono la fissazione della formalina e la successiva inclusione di paraffina. Prima dell'inclusione dei tessuti, un organo espantato può trascorrere un diverso intervallo di tempo in formalina, e questo

contribuisce ancora di più alla degradazione dell'RNA poiché la formalina induce la formazione di gruppi monometioli (-CH<sub>2</sub>OH) su basi di RNA. Il tempo che intercorre tra l'espanto d'organo – nei soggetti viventi – e la fissazione è chiamato “Ischemia Fredda” (Masuda et al. 1999). Pertanto, per prevenire un'ulteriore degradazione dell'RNA, l'inclusione deve essere eseguita entro 96 ore dall'autopsia.

### ***1.10 L'uso dei biomarcatori in medicina forense***

La scienza forense è l'applicazione di tecniche scientifiche per indagare su questioni legali. In questo campo oltre a incidenti stradali, sparatorie o percosse, devono essere inclusi omicidi, suicidi, rapimenti, stupri, etc.. Fino ad una ventina di anni or sono, l'analisi forense veniva eseguita utilizzando soprattutto l'istologia e la citologia, test chimici, test enzimatici e l'immunocromatografia. Tuttavia, questi metodi tuttavia sono molto influenzati dall'integrità e dalla datazione del campione. Le indagini richiedono prove come i fluidi corporei che rappresentano il supporto più importante nella ricostruzione del fatto reato. I fluidi corporei possono essere sangue venoso, sangue mestruale, sperma, saliva o urina. Sono utili, ad esempio, per ricostruire una scena del crimine, per determinare come è morto un individuo o come è avvenuta un'aggressione. Tuttavia, vi è la necessità di discriminare la fonte delle prove raccolte perché il DNA *profiling* fornisce solo l'identificazione dell'individuo senza fornire indizi sull'origine del campione (diagnosi di genere). Per questo motivo, i metodi basati sull'RNA sono stati introdotti nelle indagini forensi per la diagnosi del genere (Lynch e Fleming 2021). I primi potenziali biomarcatori erano mRNA che hanno un'espressione distinta nei diversi tessuti. Tuttavia, gli mRNA sono altamente soggetti a degradazione,

fenomeno che aumenta se la traccia è esposta a fattori ambientali (ad es. luci UV, temperatura, acqua, fuoco) come lo sono le prove sulla scena del crimine. I progressi nella scienza hanno permesso l'introduzione dei miRNA come migliori biomarcatori. Confrontando i miRNA con gli mRNA, sono più piccoli e più stabili. I miRNA possono essere facilmente estratti dai fluidi corporei e anche dai tessuti FFPE e per entrambi forniscono risultati validi (Silva et al. 2015) (Courts and Madea 2010) (Zubakov et al. 2010). L'importanza dei biomarcatori tessuti-specifici nella medicina legale è la loro capacità di discriminare i diversi tipi di prove raccolte. Ad esempio, i miRNA potrebbero essere chiaramente utilizzati per distinguere il sangue venoso rispetto al sangue mestruale o al sangue dal naso. Inoltre, i miRNA potrebbero fornire informazioni sull'età della ferita sottolineando se è pre mortem o post mortem, soprattutto per quanto riguarda le lesioni cutanee. Quando la pelle è ferita, inizia il processo di guarigione della ferita. Gli studi hanno suggerito che i miRNA hanno un ruolo chiave nella regolazione del processo di guarigione delle ferite. Lo stesso può essere applicato per l'indagine sull'esposizione al fuoco differenziando le lesioni ante e post mortem perché si è scoperto che i miRNA regolano anche i geni delle ustioni termiche. Inoltre, i miRNA potrebbero essere utilizzati per stimare l'intervallo post mortem (PMI), che è il fattore più impegnativo nelle indagini forensi per determinare l'ora della morte (Rocchi et al. 2020).



## CAPITOLO SECONDO

### Scopo dello studio

Gli acidi nucleici ottenuti da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina sono generalmente frammentati dal processo di fissazione e inclusione. Fra questi tessuti, quelli di origine autoptica sono caratterizzati da una degradazione ancora più estesa degli acidi nucleici dovuta essenzialmente a 3 principali fattori:

- alla lisi cellulare durante il periodo di post mortem;
- alla possibile attività microbica durante lo stesso periodo di post-mortem;
- all'esteso periodo di fissazione dei tessuti autoptici che in alcuni casi possono permanere in formalina anche per mesi.

Lo scopo di tale tesi è quello di valutare con metodiche molecolari la qualità degli RNA ottenuti da campioni autoptici relativi a soggetti deceduti per trauma cranico e di controlli relativi a decessi per altra causa con il fine ultimo di poter definire se i campioni relativi a decessi per trauma cranico presentano differenze nella qualità dell'RNA rispetto ai controlli e se in generale tali campioni sono idonei per indagini molecolari.

## **CAPITOLO TERZO**

### **Materiali e Metodi**

#### ***3.1 Casistica in esame***

I campioni esaminati in tale studio comprendono 10 casi (30 campioni) e 20 controlli. Per i campioni patologici costituiti da decessi avvenuti per trauma cranico sono stati esaminati 3 diversi campioni dell'encefalo corrispondenti alla zona encefalica del colpo, a quella del contraccolpo e un campione per il corpo calloso. Per i campioni di controllo sono stati utilizzati campioni da decessi derivanti da altre cause, diverse da cancro cerebrale o metastasi cerebrali da altre neoplasie, per cui fosse disponibile un frammento tissutale encefalico.

#### ***3.2 Taglio al Microtomo***

Prima di effettuare il taglio, i blocchetti sono collocati per 10 minuti in freezer a temperatura di -20°C e avvolti in carta stagnola per favorirne l'indurimento. Per ogni blocchetto sono state tagliate quattro sezioni da 10 µm, il materiale così tagliato è stato posto in una provetta da 1,5 ml con l'aiuto di un bisturi o di una pinzetta. Tra il taglio di un campione e l'altro la lama è stata pulita con xilene per evitare contaminazioni, la stessa procedura è stata adottata per il bisturi o la pinzetta.

### 3.3 Estrazione di RNA da tessuto FFPE

L'isolamento dell'RNA da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina è stato fatto utilizzando il kit Promega AS1440 affiancato all'impiego dell'estrattore automatico: Maxwell RSC. Le sezioni di tessuto sono state deparaffinizzate con 600  $\mu$ l di olio minerale, riscaldando il campione a 80°C per due minuti. Dopo raffreddamento del campione a temperatura ambiente viene ad esso aggiunta la mix composta da:

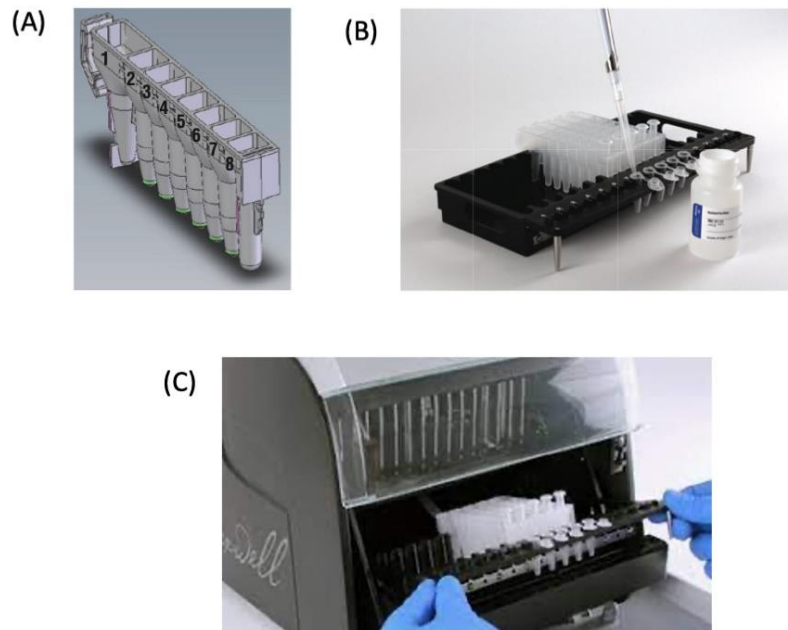
Tampone di lisi	224 $\mu$ l
Proteinasi K	25 $\mu$
Colorante blu	1 $\mu$

Vengono aggiunti ad ogni provetta 250  $\mu$ l di mix. Si mescola con vortex per 5 secondi, si centrifuga a 10000xg per 20 secondi (se c'è ancora del pellet nella fase acquosa blu bisogna mescolare gentilmente con una pipetta) e si incuba a 56°C in un blocco termostato overnight. Successivamente per modificare l'RNA e quindi liberarlo dalla presenza degli addotti monometilici, i campioni vengono riscaldati a 80°C per 1 ora. Dopo raffreddamento del campione a temperatura ambiente, si procede con la digestione con DNasi, utilizzando la mix descritta in tabella

MnCl <sub>2</sub> 0,09M	26 $\mu$
DNase Buffer	14 $\mu$
DNase I	10 $\mu$

Ad ogni campione vengono aggiunti 50  $\mu$ l di mix per la DNasi alla fase blu acquosa, si mescola pipettando e si lascia la reazione procedere a temperatura ambiente per 15 minuti. Successivamente i campioni vengono centrifugati alla massima velocità per due minuti. Per poter isolare anche i miRNA si procede con il kit Promega AS1460.

- Si trasferisce la soluzione acquosa in una nuova provetta;
- Si prepara la soluzione di omogeneizzazione con 1-Tioglicerolo. A tal fine si aggiungono 600  $\mu$ l di 1-tioglicerolo a 30 ml di soluzione di omogeneizzazione (la soluzione così costituita si conserva a 4°C per 1 mese);
- Prima dell'utilizzo la soluzione va raffreddata in ghiaccio a 4°C;
- Si aggiungono 200  $\mu$ l di soluzione di omogeneizzazione, completata con 1-tioglicerolo a ciascun campione;
- Si mescola il tutto con vortex per 20 secondi e si incuba a per 10 minuti a temperatura ambiente;
- Nel frattempo vengono preparate le cartucce per la purificazione del lisato che viene trasferito nel primo pozzetto come da Figura n (A).
- Le cartucce vengono quindi caricate nel vassoio raccoglitore come da Figura n (B) e introdotte nello strumento (Figura n (C))
- L'RNA totale viene eluito in 50  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O RNAase free (vedi provettine da 0,5 ml in Figura n (B) e (C)).



**Figura n:** (A) cartucce per la purificazione degli RNA con strumento Maxwell RSC; (B) alloggio delle cartucce nel vassoio da caricare nello strumento; (C) caricamento nello strumento

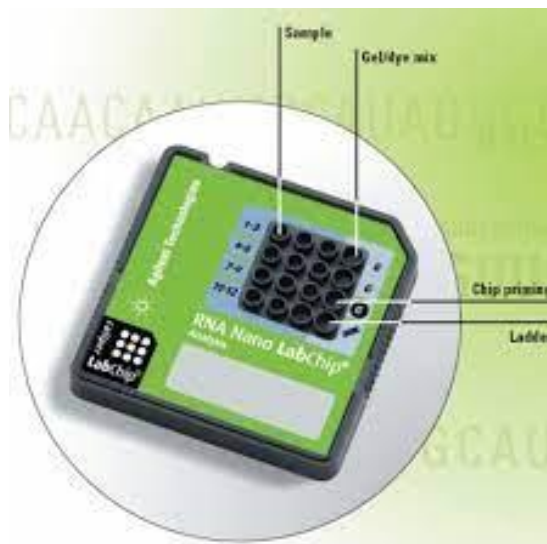
### ***3.4 Quantificazione degli RNA con Nanodrop***

La concentrazione degli RNA viene misurata con lo strumento Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) impiegando 1  $\mu$ l di soluzione di RNA. La concentrazione viene misurata in ng/ $\mu$ l unitamente ai rapporti di assorbanza  $A_{260}/A_{230}$  e  $A_{260}/A_{280}$ . Previo settaggio del bianco ( $H_2O$  RNase free), la misura della concentrazione viene fatta in duplicato per ogni campione.

### ***3.5 Agilent 2100 Bioanalyzer- RNA 6000 Nano Kit***

L'integrità degli RNA estratti viene misurata mediante elettroforesi capillare con lo strumento Agilent Bioanalyzer 2100. Lo strumento sfrutta il legame di

coloranti fluorescenti agli acidi nucleici in modo da consentire sia la quantificazione degli acidi nucleici che, via separazione microfluidica, la determinazione della qualità. Vi sono diversi kit disponibili che consentono la misura di DNA, RNA o miRNA. Nel nostro caso abbiamo impiegato il kit RNA 6000 nano, che consente di valutare l'integrità degli RNA. Il kit RNA Agilent contiene chip e reagenti progettati per l'analisi dei frammenti di RNA. Le soluzioni di RNA vengono caricate nel Chip (Figura y) (1  $\mu$ l per pozzetto), dove precedentemente è stata caricata anche la ladder di pesi molecolari. Ogni chip RNA contiene un insieme interconnesso di microcanali che viene utilizzato per la separazione dei frammenti di acido nucleico in base alle loro dimensioni. I risultati dell'analisi possono essere presentati in diverso modo: come elettroferogramma, numericamente come RNA integrity number, RIN, o come analisi dei frammenti. IL RIN è un numero ottenuto da un algoritmo strumentale che varia da 1, corrispondente all'RNA completamente degradato, a 10, corrispondente all'RNA intatto.



**Figura Y:** Chip per l'analisi con l'Agilent 2100 Bioanalyzer

### ***3.6 Paraffin-embedded RNA metric (PERM)***

Per valutare l'integrità dell'RNA isolato dai campioni di tessuto FFPE, è stata applicata la formula PERM, come precedentemente descritta [1]. La metrica PERM valuta l'integrità dell'RNA estrapolando i dati dall' elettroferogramma creato dall' Agilent 2100 Bioanalyzer. La metrica PERM si basa su un approccio ponderato dell'area sotto la curva dell'elettroferogramma rilevata a tempi diversi:

$$\text{PERM} = \text{FU25} + (2 \times \text{FU 30}) + (3 \times \text{FU35}) + (4 \times \text{FU40}) + (5 \times \text{FU45}) + (6 \times \text{FU50}) + (7 \times \text{FU55}) + (8 \times \text{FU60}) + (9 \times \text{FU65})$$

Il PERM è calcolato raccogliendo le unità di fluorescenza a partire da 25 secondi fino a 65 secondi con intervalli di 5 secondi. Le unità di fluorescenza registrate vengono poi moltiplicate per un fattore che va a pesare il contributo di ogni singolo intervallo. La metrica attribuisce un valore progressivamente maggiore per frammenti di RNA maggiori. La metrica PERM è applicabile solo all'RNA estratto da tessuto fissato e incluso in paraffina.

### ***3.7 Sintesi cDNA per RNA ottenuto da tessuti FFPE***

Allo scopo di lavorare in condizioni RNase free la sintesi del cDNA viene allestita sotto una cappa a flusso laminare, su una superficie precedentemente pulita usando pipette pulite e plastiche usa e getta RNase free. La reazione per la sintesi del cDNA prevede di poter impiegare un volume massimo di RNA (già sottoposto a digestione con DNasi) pari a 6,85 µl [2]. L'RNA da retrotrascrivere viene trasferito in una nuova provetta da 0,5 o 0,2 ml unitamente a 2 µl di soluzione di esameri random 3µg/µl e H<sub>2</sub>O fino a un

volume finale di 8,85  $\mu$ l e sottoposto a denaturazione per 10 minuti a 65°C. Il sistema così costituito viene quindi raffreddato in ghiaccio e brevemente centrifugato. Successivamente viene aggiunto il mix di reazione (11,15  $\mu$ l) contenente:

4  $\mu$ l di 5X RT Buffer (1X in 20  $\mu$ l)

2  $\mu$ l di DTT 100 mM (10 mM finale)

0,2  $\mu$ l di RNase Inhibitor (40U/ml) (40 U finale)

1,8  $\mu$ l di MgCl<sub>2</sub> 50 mM (7,5 mM finale)

2  $\mu$ l di 10 mM DNTP (1 mM finale)

1,25  $\mu$ l di M-MLV Reverse Transcriptase Invitrogen (200 U/  $\mu$ l) (250 U finale)

- Per favorire l'appaiamento degli esameri random il sistema viene incubato a 25°C per 10 minuti e quindi si procede con la reazione di retrotrascrizione a 37°C per 50-60 minuti.

Al termine di tale tempo la reazione viene bloccata inattivando l'enzima per riscaldamento a 70°C per 15 minuti

I campioni di cDNA così ottenuti vengono aliquotati e conservati a -20°C fino all'uso (si conservano preferibilmente a -80°C per periodi più lunghi).

### ***3.8 Selezione dei geni e primers***

In tale studio abbiamo esaminato la qualità dell'RNA ottenuto da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina da materiale autoptico. Uno dei metodi



impiegati a tale scopo è stata la real time PCR per la rilevazione di geni house-keeping. I geni housekeeping considerati sono stati la  $\beta$ -Aactina (ACTB), la  $\beta$ 2 microglobulina ( $\beta$ 2M), il GAPDH e il gene PPIB. Per tali sistemi sono stati sintetizzati sia i primer senso (up) che antisenso (dw) per l'allestimento della PCR che una sonda interna (probe), marcata con fluoroforo per la rilevazione specifica in real time dell'amplificato.

Gene	Primer
ACTB	Up – 5'- GTG GAT CAG CAA GCA GGA GT – 3' Dw – 5' – AAA GGG TGT AAC GCA ACT AAG TCAT T – 3' Probe – 5'- C ACC GCA AAT GTC TC – 3'
$\beta$ 2M	Up – 5' – TTG TCA CAG CCC AAG ATA GTT – 3' Dw – 5' – ATT TGG ATT GGA TGA ATT CC – 3' Probe – 5' – AGC AGG ATC ATG GAG GTT – 3'
GAPDH	Up – 5' – GTC AAG GTC GAG AAC GGG AAG – 3' Dw – 5' – CAT CGC CCC ACT TGA TTT TG – 3' Probe – 5' – C CAG GAG CGA GAT C – 3'
PPIB	Up– 5' – AGT GGA TAA TTT TGT GGC CTT AG – 3' Dw– 5' – TGA AGT CCT TGA TTA CAC GAT GG – 3' Probe– 5' – ACA GGA GAG AAA GGA TTT GGC T – 3'

### 3.9 Real time PCR

A partire dai cDNA ottenuti dal precedente step di retrotrascrizione, sono stati valutati i livelli di espressione dei geni housekeeping GAPDH, ACTB,  $\beta$ 2Me PPIB. In ogni sistema in esame per entrambi i geni, sono state utilizzate condizioni ottimali di amplificazione, ovvero concentrazione di  $MgCl_2$ , temperatura di appaiamento e durata dell'estensione.

#### TABELLA

La real-time è stata effettuata in un volume finale di 20  $\mu$ L per replica contenente:

	( $\mu$ L/campione)
Jumpstart ReadyMix Taq (Sigma)	10 $\mu$ L
Primer Forward 30 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
Primer Reverse 30 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
TaqMan Probe MGB 10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ L

A questi è stata aggiunta la quantità necessaria di  $MgCl_2$ , e di cDNA e l'opportuna quantità d'acqua per raggiungere il volume finale di 20  $\mu$ L.

Il profilo termico di amplificazione prevedeva una denaturazione a 95°C per tempi variabili a seconda del gene esaminato, 45 cicli ciascuno comprendente una fase di denaturazione a 95°C per 20 secondi, una fase di appaiamento/annealing alla temperatura ottimale per 1 minuto. Solo nel caso di PPIB l'appaiamento e l'estensione sono stati fatti separatamente come da tabella W. Durante la fase di estensione, ad ogni ciclo, viene acquisita la fluorescenza generata dall'attività 5'- nucleasica della Taq polimerasi.

Per associare i dati ottenuti dalla real time PCR con quelli dell'agilent 2100 BioAnalyzer per ogni campione è stato amplificato 1 µl di cDNA per 10 µl di soluzione finale di PCR. Le amplificazioni sono state fatte in un termociclatore MasterCycler ep Realplex Eppendorf.

Le condizioni di PCR per i geni esaminati sono riportate in tabella W.

Tabella W: condizioni di PCR per gli housekeeping esaminati

Gene	Denaturazione iniziale	Appaiamento	Estensione	Lunghezza amplicone
ACTB	3 min @ 95°C	1 min @ 54°C	/	97 basi
β2M	10 min @ 95°C	1 min @ 60°C	/	74 basi
GAPDH	3 min @ 95°C	1 min @ 54°C	/	91 basi
PPIB	2 min @ 95°C	30 sec @ 58°C	30 sec @ 68°C	86 basi

### ***3.10 Analisi statistica***

La ricerca di possibili associazioni tra le variabili in esame è stata fatta con l'applicazione sia di test parametrici che non parametrici, dipendentemente dalla distribuzione dei dati per le diverse variabili. Nel caso di variabili continue è stato impiegato il test t Student o ANOVA (one-way), dipendentemente dalla numerosità dei gruppi. Per le variabili continue non parametriche abbiamo impiegato il test di Kruskal-Wallis. Il test dei ranghi di Spearman è stato applicato per valutare la presenza di possibili correlazioni per variabili non parametriche. Abbiamo fatto l'analisi di regressione lineare per verificare le correlazioni ritrovate con il test dei ranghi di Spearman. Tutti i valori di p- sono

a due code e valori di  $p < 0.05$  sono considerati statisticamente significativi. Per il test di Kruskal-Wallis il valore di significatività è quello aggiustato, dato dal test medesimo di volta in volta. Valori di  $p$  fra 0.05 e 0.08 sono considerati “borderline”. Le analisi statistiche sono state fatte con l’impiego di un software dedicato (Stata/SE 16 package; Stata, College Station, TX).

## CAPITOLO QUARTO

### Risultati e discussione

#### *4.1 Concentrazione degli estratti*

In tale studio abbiamo esaminato complessivamente 50 campioni, suddivisi in 20 controlli e 10 casi. Negli ultimi abbiamo esaminato 3 tessuti corrispondenti al colpo, contraccolpo e corpo calloso.

La prima variabile esaminata in tale studio è stata la concentrazione degli estratti di RNA ottenuti dai campioni autoptici esaminati in tale studio. La variabile concentrazione è stata altresì rilevata mediante misura spettrofotometrica al Nanodrop e mediante il kit 6000 RNA nano sullo strumento Agilent Bioanalyzer. La concentrazione media rilevata al nanodrop era di 64,7 ng/μl (range 11,6-195,8) ed è risultata significativamente più elevata di quella ottenuta con l'Agilent Bioanalyzer (38,4 ng/μl; range 3,0-150,0) come evidenziato nella Figura 4.1, mostrando una possibile sovrastima per le misure spettrofotometriche.

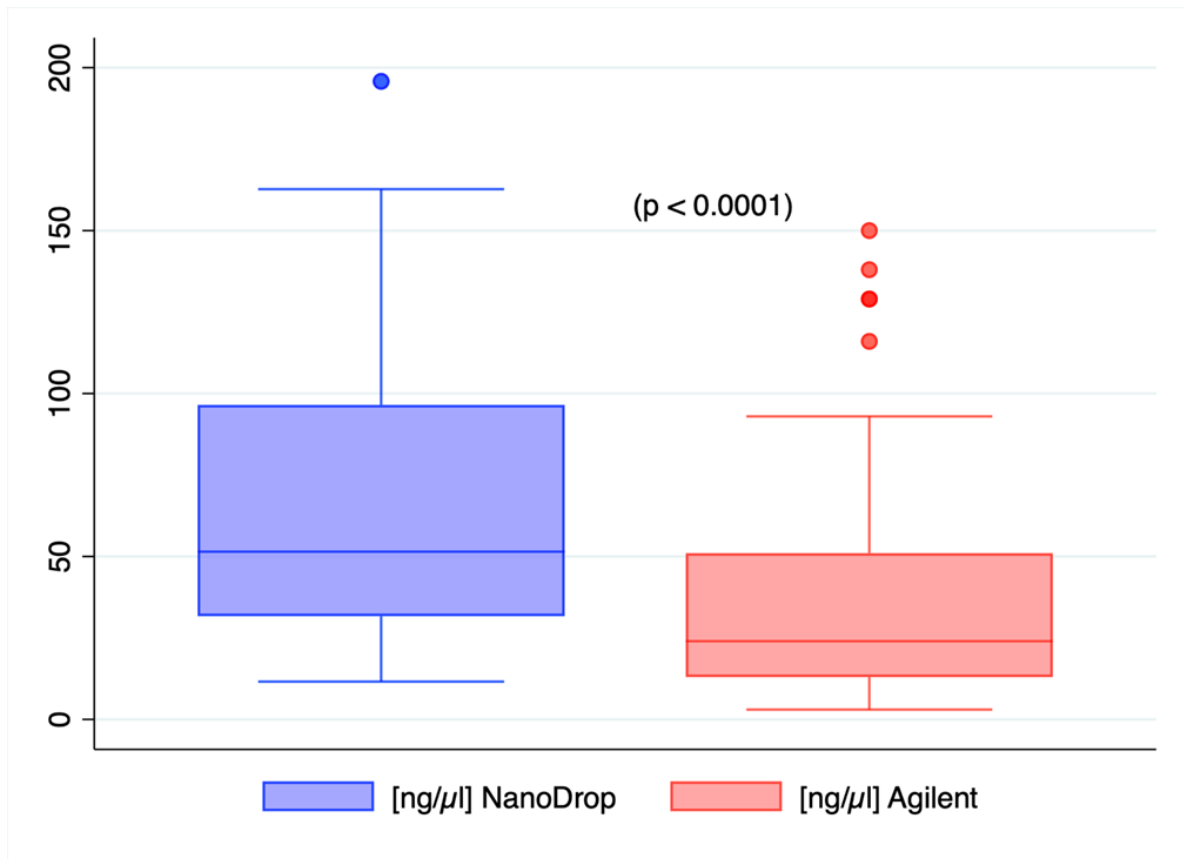


Fig. 4.1 Box plot rappresentante la concentrazione misurata al Nanodrop e all'Agilent BioAnalyzer

Come atteso, comunque, i valori di concentrazione rilevati con i due sistemi sono risultati correlati ( $p < 0,0001$ ,  $R^2 = 0,551$ ,  $R = 0,748$ ) come raffigurato in Figura 4.2.

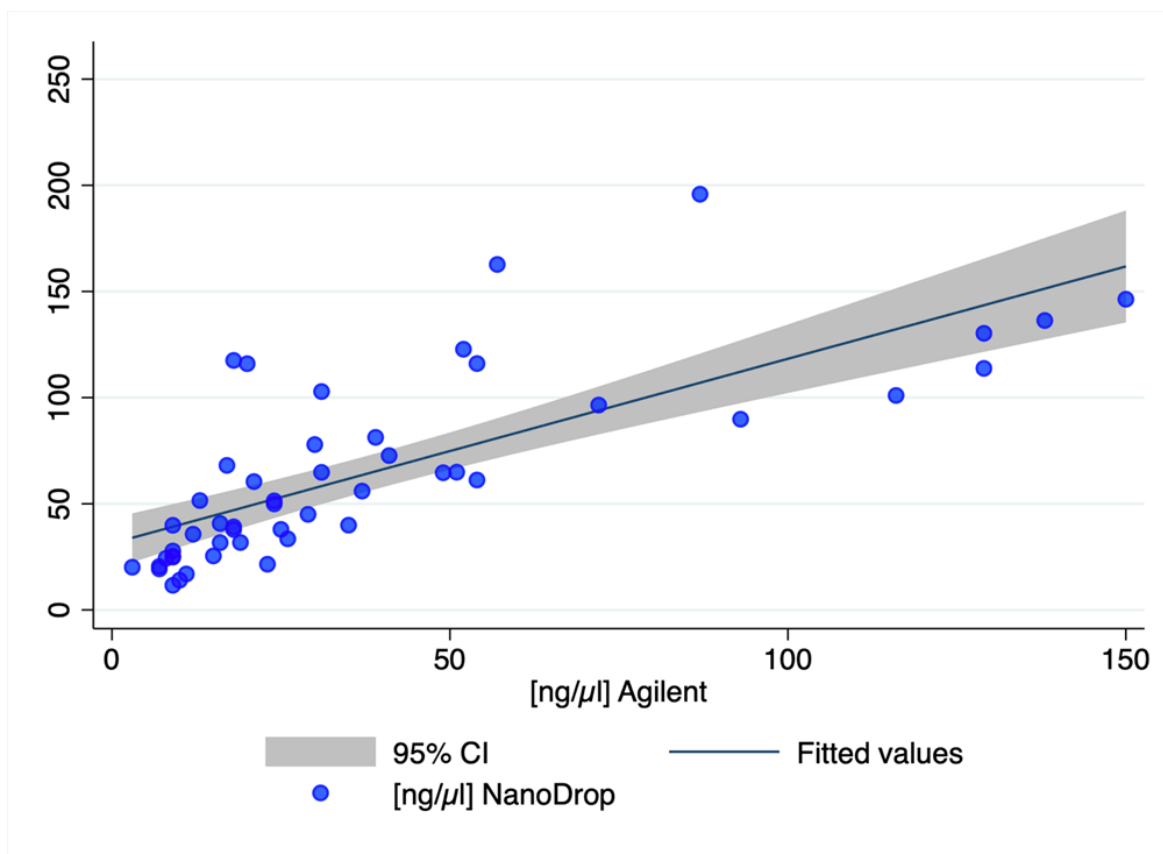


Fig. 4.2 Scatter plot e retta di regressione fra la concentrazione misurata al Nanodrop e all'Agilent BioAnalyzer

Essendo la nostra casistica composta sia da casi costituiti da campioni encefalici di soggetti deceduti per trauma cranico e da controlli relativi ad encefali di soggetti deceduti per altra causa diversa da trauma cranico o cancro al cervello, abbiamo confrontato i valori di concentrazione fra casi e controlli. Nuovamente, si evidenziano delle differenze nei risultati ottenuti con le due strumentazioni: le misure spettrofotometriche non evidenziano differenze significative nella concentrazione di casi e controlli sebbene i controlli risultino mediamente più concentrati ( $p = 0,2$ ), mentre all'Agilent Bioanalyzer la concentrazione dei controlli è significativamente più elevata di quella dei casi ( $p = 0,006$ ) come evidenziato in Figura 4.3.

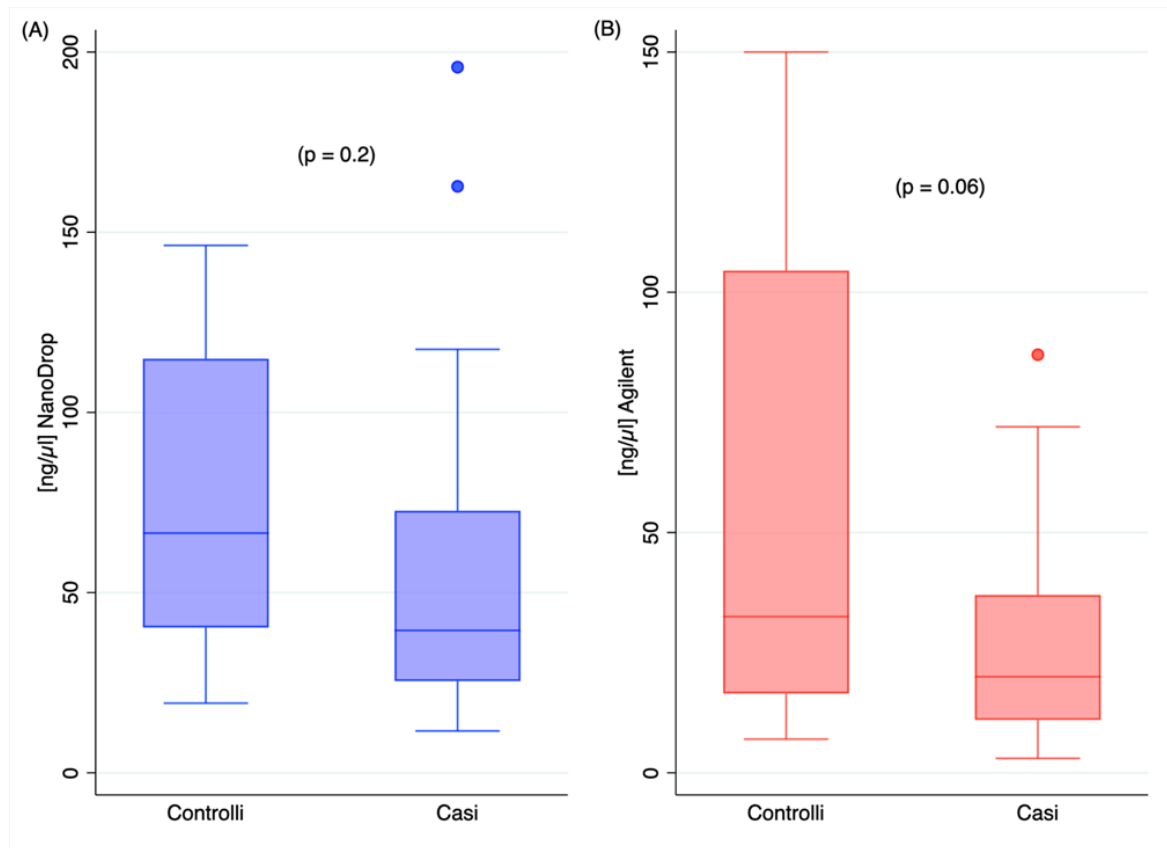


Fig. 4.3 Box plot rappresentante la concentrazione misurata al Nanodrop (A) e all'Agilent BioAnalyzer (B) in casi e controlli

Tale differenza nei valori di concentrazione fra casi e controlli può esser attribuita a due diversi fattori: in primo luogo il sistema elettroforetico dell'Agilent BioAnalyzer rileva la concentrazione solo degli RNA e solo per gli RNA da esso rilevabili, mentre per la misura spettrofotometrica la concentrazione è rilevata sia per l'RNA che per l'eventuale contaminazione da DNA e anche per RNA estremamente degradati.

Suddividendo invece i campioni in base al tipo di reperto, quindi per i casi in colpo, contraccollo, corpo calloso; e controlli non si sono evidenziate differenze significative nella concentrazione dell'estratto di RNA né alle misure spettrofotometriche ( $p = 0.3$ ) né a quelle fatte con l'Agilent BioAnalyzer ( $p = 0.06$ ).



## 4.2 Metrica RIN (RNA INTEGRITY NUMBER)

La qualità degli RNA è stata determinata mediante l'analisi Agilent Bioanalyzer secondo la metrica RIN (RNA Integrity Number). Lo strumento Agilent Bioanalyzer dà come output un elettroferogramma e un'immagine simile ai gel di acrilamide, come evidenziato in Figura 4.4.

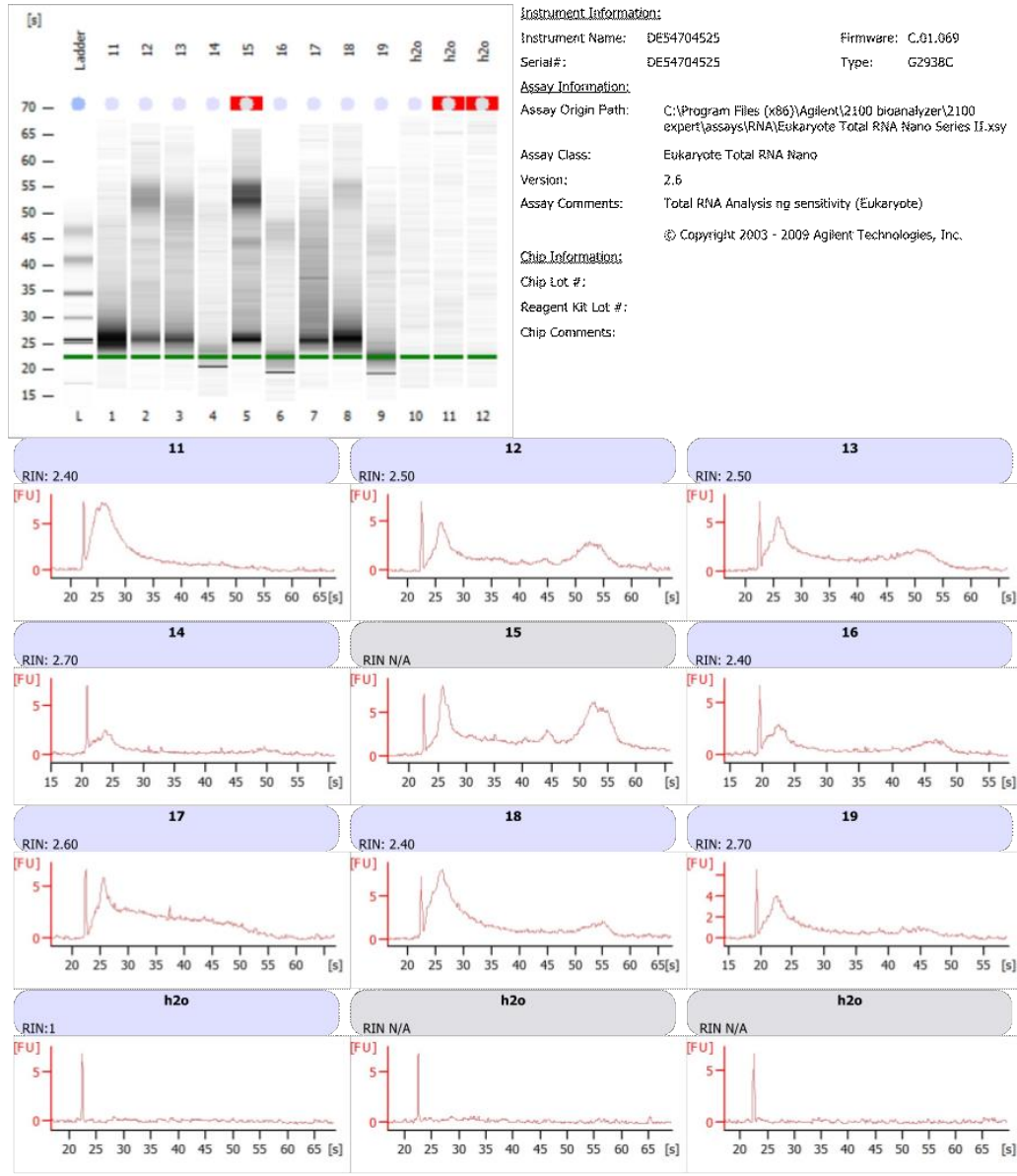


Fig. 4.4 Esempio di output da Agilent BioAnalyzer per la casistica in esame. In alto l'output sotto forma di gel, in basso gli elettroferogrammi per ciascun campione caricato.

Il RIN è stato sviluppato per rimuovere l'interpretazione individuale nel controllo di qualità dell'RNA. Tiene conto dell'intera traccia elettroforetica e consente la classificazione dell'RNA totale eucariotico, sulla base di un sistema di numerazione da 1 a 10, dove 1 è il profilo più degradato e 10 il più intatto. In questo modo viene facilitata l'interpretazione dell'elettroferogramma. Purtroppo, tale misura non rappresenta una metrica discriminante per i campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina in quanto risultano sempre piuttosto degradati e i valori di RIN che mediamente si aggirano intorno ad un valore di 2 non consentono di fare una stima dell'applicabilità all'estratto di RNA di diverse tecniche molecolari.

Nella nostra serie di campioni il RIN è stato rilevato in 38 campioni complessivamente con un valore medio di 2,29 (range 1,00-5,30). Tale metrica non è risultata variare in modo significativamente diverso né fra casi e controlli ( $p = 0,3$ ), né fra tipo di reperto (colpo, contraccollo, corpo calloso e controlli) ( $p = 0,5$ ). La variabile RIN non è risultata associata né alla concentrazione spettrofotometrica ( $p = 0,4$ , Spearman rho = 0,1), né a quella ricavata dall'Agilent Bioanalyzer ( $p = 0,06$ , Spearman rho = 0,3).

### ***4.3 Metrica PERM***

Un altro metodo per valutare la qualità dell'RNA da FFPE è chiamato "Paraffin embedded RNA metrics" (PERM) e venne sviluppato da Chung e colleghi nel 2016 (1). La metrica è un RIN modificato basata sul calcolo dall'area sotto la traccia dell'elettroferogramma pesata per frammenti più intatti di RNA. In tale studio abbiamo valutato il PERM per i campioni in esame e confrontati con le altre variabili raccolte in tale studio, quale la concentrazione dei campioni, il RIN e i risultati delle analisi RT-PCR per diversi geni housekeeping. Il valore

medio del PERM nella nostra coorte di casi è di 17,2 (range: 0,91-100) risultando significativamente più alto nei controlli rispetto ai casi ( $p = 0,02$ ), ma senza differenze significative quando i campioni sono stati suddivisi in base al reperto in colpo, contraccolpo e corpo calloso ( $p = 0,2$ )

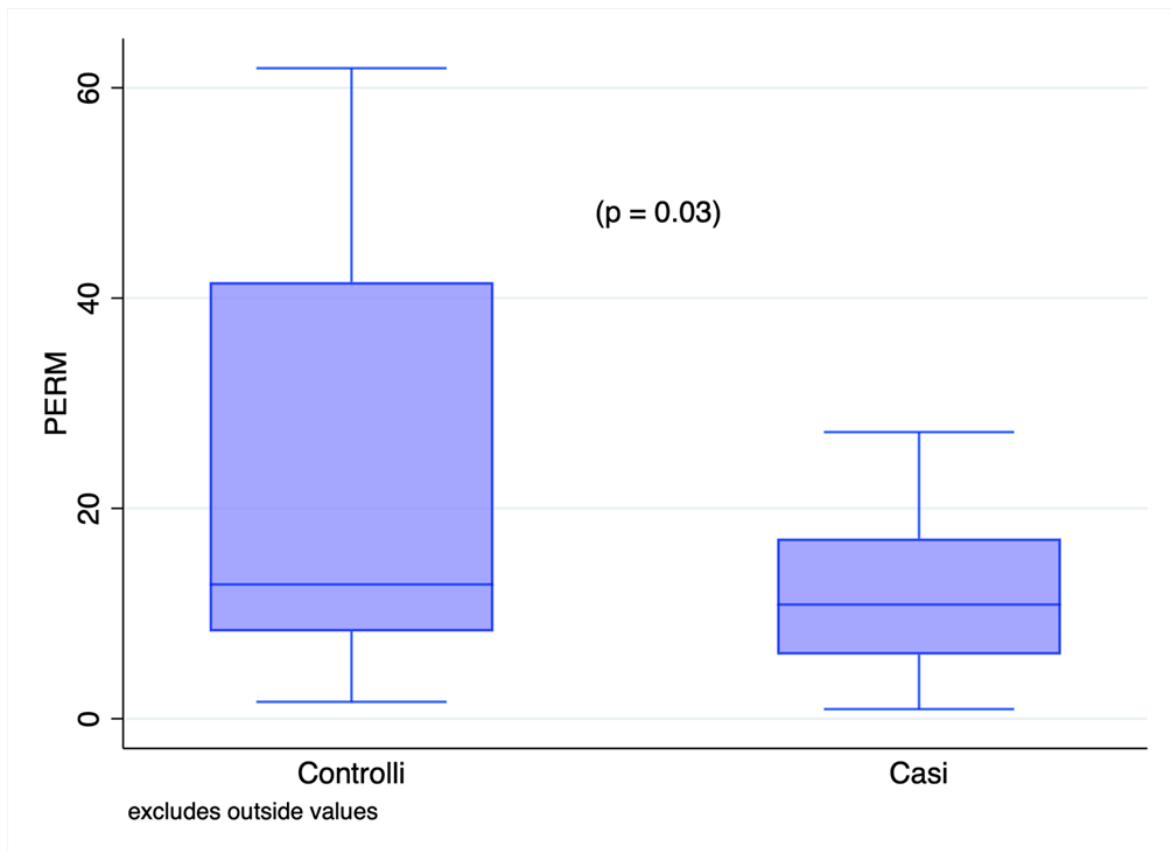


Fig. 4.5 Box plot rappresentante la metrica PERM in casi e controlli (gli outlier sono esclusi dal rappresentazione grafica)

Tali risultati evidenziano che per quanto concerne il PERM vi sembra essere una miglior conservazione dell' RNA dei controlli rispetto ai casi (Figura 4.5). Questo risultato può esser dovuto a molteplici e concomitanti fattori quali il diverso intervallo di post mortem e il diverso tempo di fissazione in formalina, che nei campioni autoptici non è quasi mai controllato. Non è tuttavia da escludere la possibilità che la diversa degradazione possa esser dovuta agli anni

di processazione dei tessuti, poiché è noto che le biomolecole, RNA inclusi, continuano a degradare durante la conservazione negli archivi (2).

La metrica PERM è risultata associata significativamente sia con concentrazione da lettura spettrofotometrica al Nanodrop ( $p < 0,0001$ , Spearman  $\rho = 0,83$ ), sia alla concentrazione rilevata con l'Agilent BioAnalyzer ( $p < 0,0001$ , Spearman  $\rho = 0,79$ ) come illustrato in Figura 4.6.

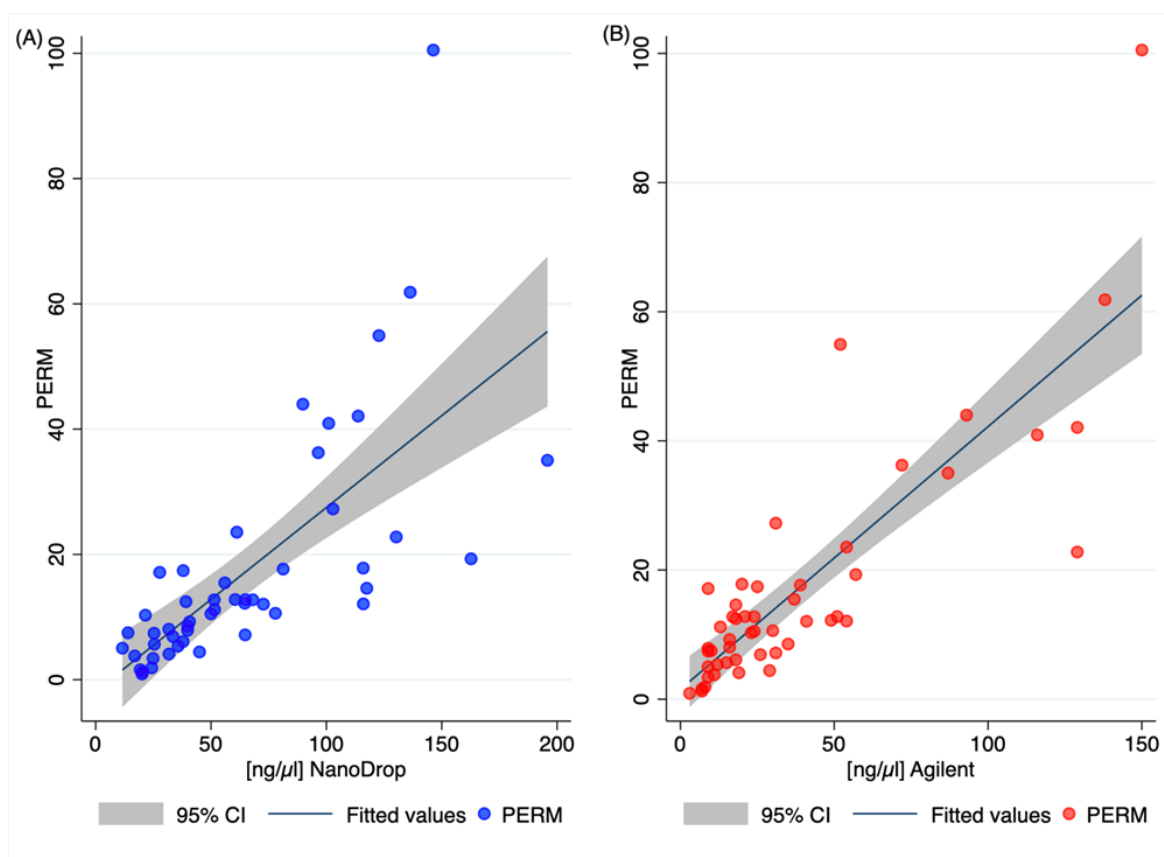


Fig. 4.6 Scatter plot e retta di regressione fra il PERM e la concentrazione spettrofotometrica misurata al Nanodrop (A) e all'Agilent BioAnalyzer (B).

Tale risultato evidenzia una correlazione fra concentrazione degli estratti di RNA e la loro qualità, come rilevata dal PERM. Tale correlazione non è generalmente osservata nei tessuti di origine biotica o chirurgica dove la concentrazione dell'estratto non determina la sua qualità in termini di massima

amplificabilità (3). Non vi sono tuttavia pubblicazioni scientifiche che descrivano la qualità dell'estratto in termini di metrica PERM.

#### ***4.4 Analisi dei frammenti***

Oltre alla metrica RIN e PERM dall'analisi all'Agilent BioAnalyzer si sono anche ricavate le quantità relative di frammenti nelle seguenti regioni:

- 1: fra 25 e 75 basi,
- 2: fra 76 e 100 basi
- 3: fra 101 e 150 basi
- 4: fra 151 e 200 basi
- 5: fra 201 e 250 basi
- 6: fra 251 e 300 basi

I valori medi e range registrati per i nostri campioni nelle diverse regioni sono riportati in tabella 4.1.

Tabella 4.1: Valori delle regioni nella casistica in esame.

<b>Regione</b>	<b>Media</b>	<b>Range: min-max</b>
1: 25 -75 b	13,9	0-70,6
2: 76 - 100 b	9,18	0-38,6
3: 101 - 150 b	11,37	0-52,9
4: 151 – 200 b	6,72	0-32,4
5: 201 – 250 b	0,34	0-2,3
6: 251 – 300 b	0,39	0-2,5

La distribuzione dei frammenti nelle diverse regioni in casi e controlli è risultata significativamente diversa solo per le ragioni 5 e 6 ( $p = 0,004$  e  $p = 0,003$ , rispettivamente) con una maggior quantità di frammenti più lunghi nei controlli rispetto ai casi, come evidenziato in Figura 4.7.

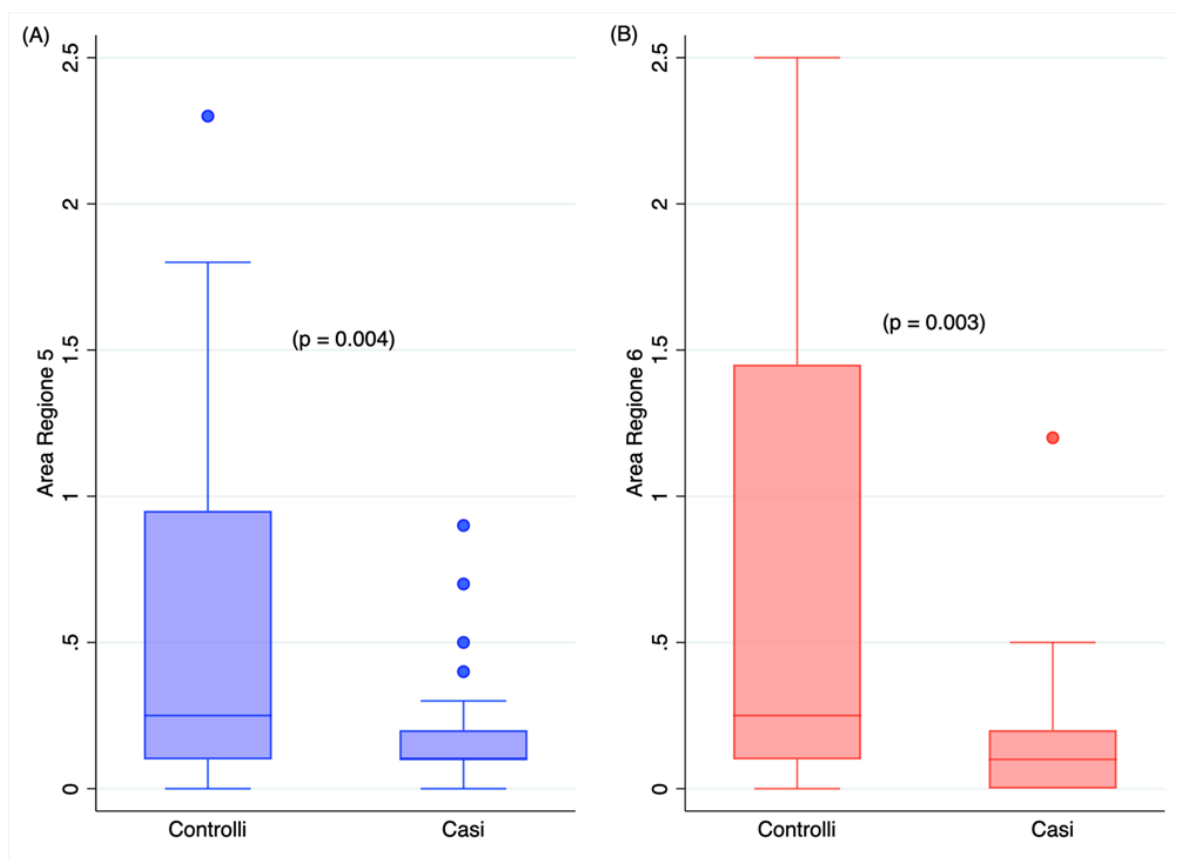


Fig. 4.7 Box plot rappresentante la distribuzione dei frammenti nella regione 5 (A) e 6 (B) in casi e controlli

La distribuzione dei frammenti nelle diverse regioni in esame non è risultata variare in modo significativo quando i casi venivano ulteriormente suddivisi in colpo, contraccolpo e corpo calloso.

La quantità di frammenti registrata in alcune regioni, soprattutto quelle centrali, è correlata alla concentrazione degli estratti di RNA, sia nella determinazione spettrofotometrica al Nanodrop che quella ricavata all'Agilent BioAnalyzer,

come riportato in tabella 4.1. I nostri risultati hanno anche evidenziato che vi sono delle associazioni fra le regioni sopraccitate e le metriche PERM e RIN, come riportato in tabella 4.2. Il RIN correla solo con le regioni estreme e comunque ha una correlazione più debole del PERM. Quest'ultimo, infatti, per disegno stesso della metrica, che è una media pesata, risulta avere una correlazione significativa positiva con le regioni dell'analisi dei frammenti a partire dalla regione 3 in poi.

Tabella 4.2: Correlazioni fra la distribuzione dei frammenti nelle regioni 1-6, la concentrazione degli estratti e le metriche RIN e PERM (Test di Spearman). Sono riportati i valori di p del test e il valore di rho.

<b>Regione</b>	<b>Concentrazione al Nanodrop - rho, (p)</b>	<b>Concentrazione all'Agilent BioAnalyzer- rho, (p)</b>	<b>RIN -rho, (p)</b>	<b>PERM -rho, (p)</b>
1: 25 -75 b	0,085 (0,5)	0,003 (1,0)	-0,34 (0,03)	- 0,05 (0,7)
2: 76 - 100 b	0,31 (0,03)	0,2 (0,2)	-0,24 (0,1)	0,20 (0,2)
3: 101 - 150 b	0,64 (< 0,0001)	0,48 (0,0004)	-0,12 (0,5)	0,51 (0,0001)
4: 151 – 200 b	0,67 (< 0,0001)	0,79 (< 0,0001)	0,13 (0,4)	0,83 (< 0,0001)
5: 201 – 250 b	0,69 (< 0,0001)	0,79 (< 0,0001)	0,26 (0,1)	0,74 (< 0,0001)
6: 251 – 300 b	0,003 (1,0)	0,003 (1,0)	0,34 (0,04)	0,71 (< 0,0001)

In Figura 4.8 è riportato un esempio di correlazione per la regione 5, la concentrazione e le metriche in esame. Il grafico evidenzia chiaramente che per

il RIN la correlazione è estremamente debole (o spuria), a suggerire che tale metrica non è adatta all'RNA isolato da materiale fissato in formalina e incluso in paraffina, come già riportato in altri studi (1, 4).

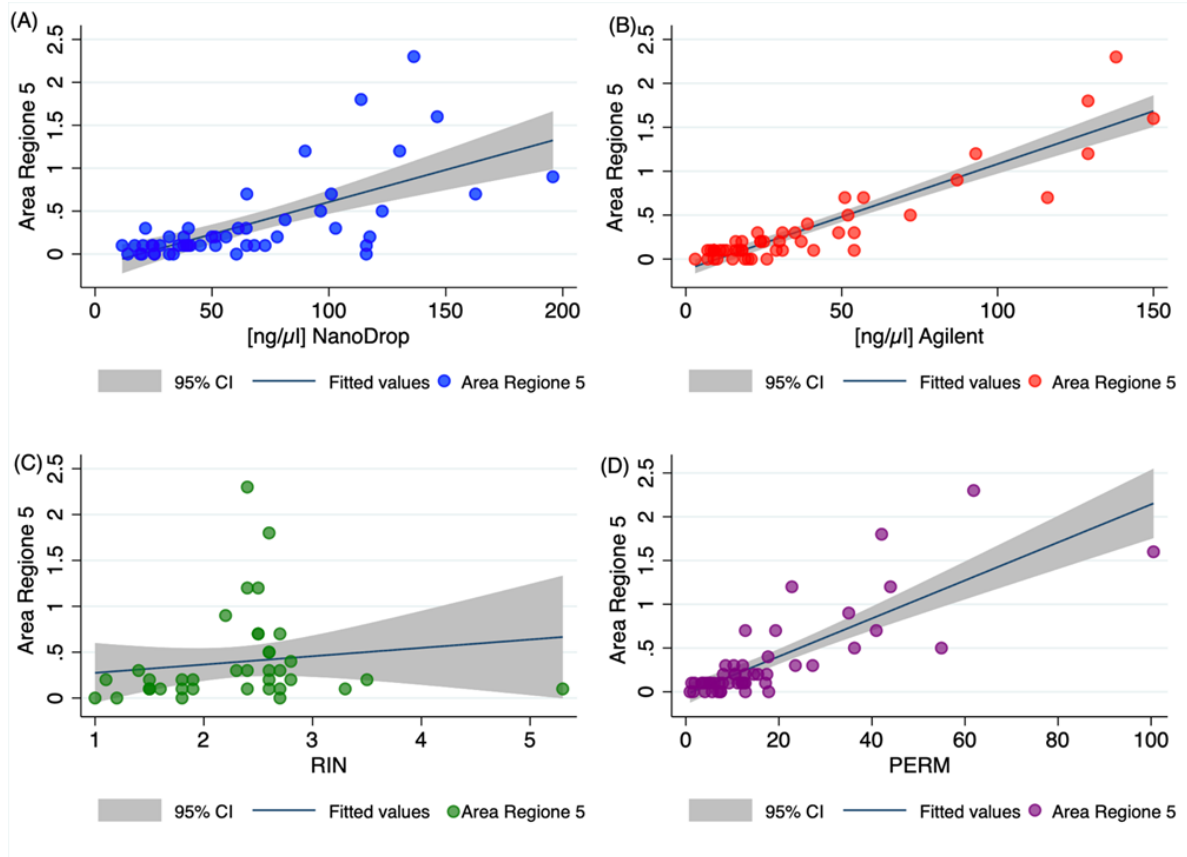


Fig. 4.8 Scatter plot e retta di regressione fra l'area sotto la regione 5 e la concentrazione spettrofotometrica misurata al Nanodrop (A), all'Agilent BioAnalyzer (B), la metrica RIN (C) e la metrica PERM (D). Da tale analisi si evidenzia che quando il campione ha una buona concentrazione l'output dell'Agilent BioAnalyzer risulta più affidabile consentendo sia il calcolo della metrica PERM che l'analisi dei frammenti.



#### 4.5 Real Time PCR

I 4 geni housekeeping analizzati nella presente tesi, ovvero la Peptidilprolil Isomerasi B o ciclofillina B (PPIB), la Beta 2 microglobulina (B2M), la gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi (GAPDH) e la Beta-actina (ACTB), sono stati sottoposti ad amplificazione caricando 1  $\mu$ l di cDNA per 10  $\mu$ l di reazione finale di Real Time PCR. Questa strategia rispecchia il metodo Agilent Bioanalyzer, in cui si carica 1  $\mu$ l di estratto di RNA, indipendentemente dalla sua concentrazione iniziale. Utilizzando questa strategia, la tesi mira a indagare sulla qualità dell'mRNA. In tabella 4.3 sono riportati i valori di Ct medio per ogni gene housekeeping esaminato.

Tabella 4.3: Valori medi dei geni housekeeping esaminati. SD deviazione standard

<b>Gene</b>	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Lunghezza ampliconi</b>
PPIB	33,24	3,10	23,98	39,43	86
ACTB	30,63	3,88	24,21	36,98	97
B2M	33,73	3,02	27,18	44,04	74
GAPDH	30,92	3,92	23,41	39,74	95

Abbiamo valutato la dipendenza di ogni gene housekeeping dalla concentrazione di cDNA, mediante un'analisi di regressione. Il test statistico correla la quantità di cDNA caricata, non la quantità di RNA totale isolato in termini di concentrazione. La correlazione tra la quantità di cDNA e i valori di soglia è rappresentata nella Figura 4.9.

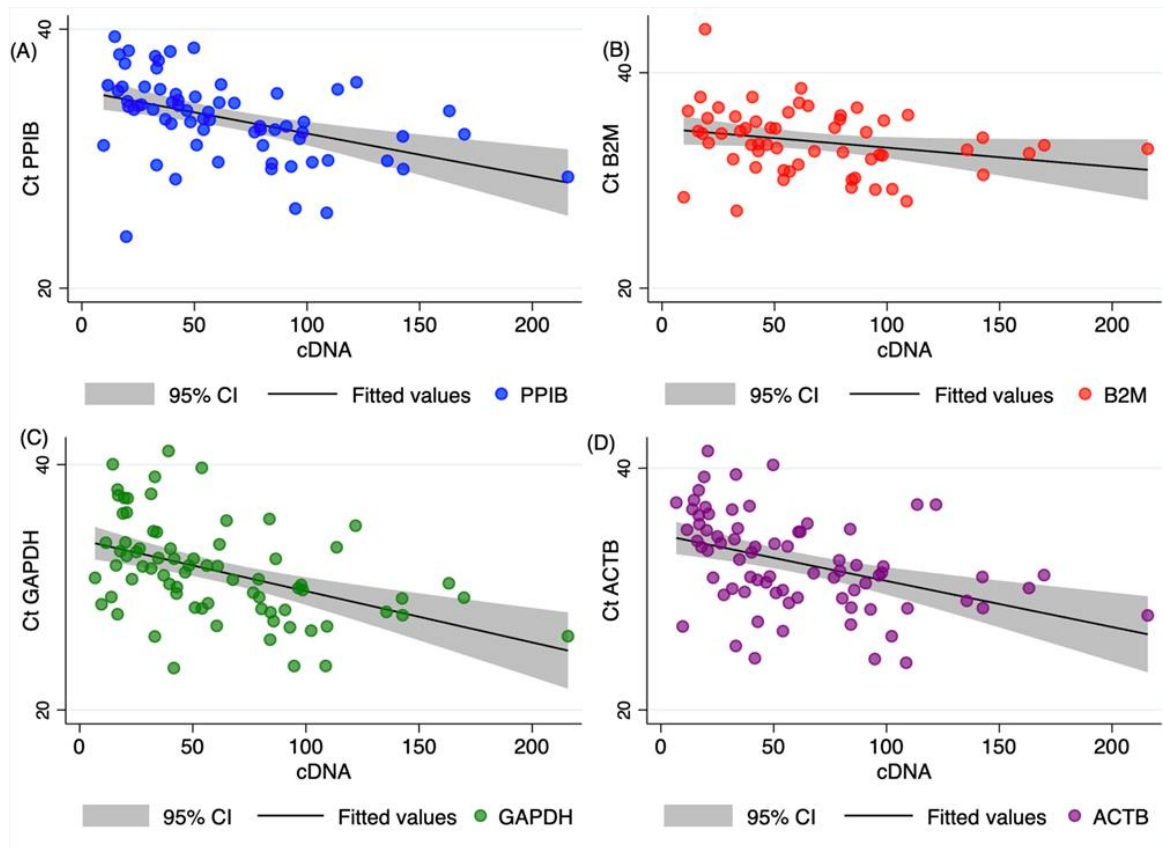


Fig. 4.9 Scatter plot e retta di regressione fra i valori dei cicli soglia (Ct) per ciascun housekeeping e la quantità di cDNA per singola PCR : (A) PPIB, (B) B2M, C (GAPDH), D (ACTB).

Come atteso la regressione lineare ha dato quasi sempre risultati significativi anche quando veniva correlato il valore medio del ciclo soglia di geni housekeeping con la concentrazione spettrofotometrica al Nanodrop e all'Agilent BioAnalyzer in virtù del fatto che sono state retrotrascritte quantità diverse di RNA totale, dipendentemente dalla concentrazione iniziale del campione. I risultati delle diverse analisi di regressione sono riportati in tabella 4.4. Si evidenzia che solo per la Beta Actina (ACTB) non si ha una correlazione fra la concentrazione dell'RNA e il ciclo soglia medio ( $p$  value= 0.7).

Tabella 4.4: Risultati della regressione lineare fra i valori medi dei geni housekeeping esaminati e la concentrazione esaminata al Nanodrop o all'Agilent BioAnalyzer. Si riportano R<sup>2</sup> e (p).

<b>Gene</b>	<b>Nanodrop R<sup>2</sup>, (p)</b>	<b>Agilent BioAnalyzer R<sup>2</sup>, (p)</b>
PPIB	0,163 (0,0005)	0,0457 (0,2)
ACTB	0,0075 (0,7)	0,0106 (0,7)
B2M	0,071 (0,02)	0,156 (0,01)
GAPDH	0,0878 (0,02)	0,0218 (0,3)

Successivamente, abbiamo esaminato se vi fosse una differenza nei cicli soglia dei diversi geni housekeeping fra casi e controlli e fra tipo di campione (colpo, contraccollo e corpo calloso).

I risultati dell'analisi statistica sono riportati in tabella 4.5 e non evidenziano risultati significativamente diversi.

Tabella 4.5: Risultato del test di Kruskal Wallis fra il ciclo soglia dei diversi geni housekeeping e i campioni suddivisi in casi e controlli e in base al tipo di campione (colpo, contraccollo e corpo calloso)

<b>Gene</b>	<b>p (casi/controlli)</b>	<b>p (tipo di caso/controlli)</b>
PPIB	0,2	0,3
ACTB	0,2	0,2
B2M	0,09	0,6
GAPDH	0,6	0,8

I valori dei cicli soglia medi di ciascun gene housekeeping sono stati poi relazionati alle altre metriche esaminate, ovvero RIN, PERM e analisi dei frammenti per vedere se vi fossero delle associazioni fra i due sistemi analitici di elettroforesi e di real time PCR.

Il test di Spearman fra i cicli soglia medi dei geni housekeeping e i valori di RIN ha mostrato risultati significativi solo per la Beta-Actina ( $p = 0,01$ ), evidenziando una possibile dipendenza inversa fra l'espressione della Beta-Actina e il RIN. Da successiva regressione lineare le due misure sono risultate correlate significativamente ( $p = 0,03$ ,  $R^2 = 0,397$ ). Tale risultato però può esser alterato dal fatto che l'analisi dell'RT-PCR per la beta Actina è stata eseguita per un numero inferiore di casi e controlli rispetto agli altri tre target. Per gli altri geni esaminati, invece, non si è evidenziata alcuna possibile dipendenza fra le due misure.

Successivamente abbiamo condotto un'analisi analoga con la metrica PERM. I risultati del test di Spearman sono riportati in tabella 4.6 ed evidenziano una correlazione fra il PERM e i geni housekeeping GAPDH e B2M, ma non PPIB e ACTB. La dipendenza fra le due metriche è stata confermata dalla regressione lineare solo nel caso di B2M (Figura 4.10).

Tabella 4.6: Correlazioni fra la l'espressione dei housekeeping esaminati e la metrica PERM con il test dei ranghi di Spearman e la regressione lineare

<b>Geni</b>	<b>Spearman -rho, (p)</b>	<b>Regressione lineare – R<sup>2</sup>, (p)</b>
PPIB	-0,29 (0,06)	0,017 (0,4)
ACTB	-0,11 (0,7)	0,0057 (0,8)

B2M	-0,45 (0,005)	0,19 (0,006)
GAPDH	-0,35 (< 0,01)	0,02 (0,3)

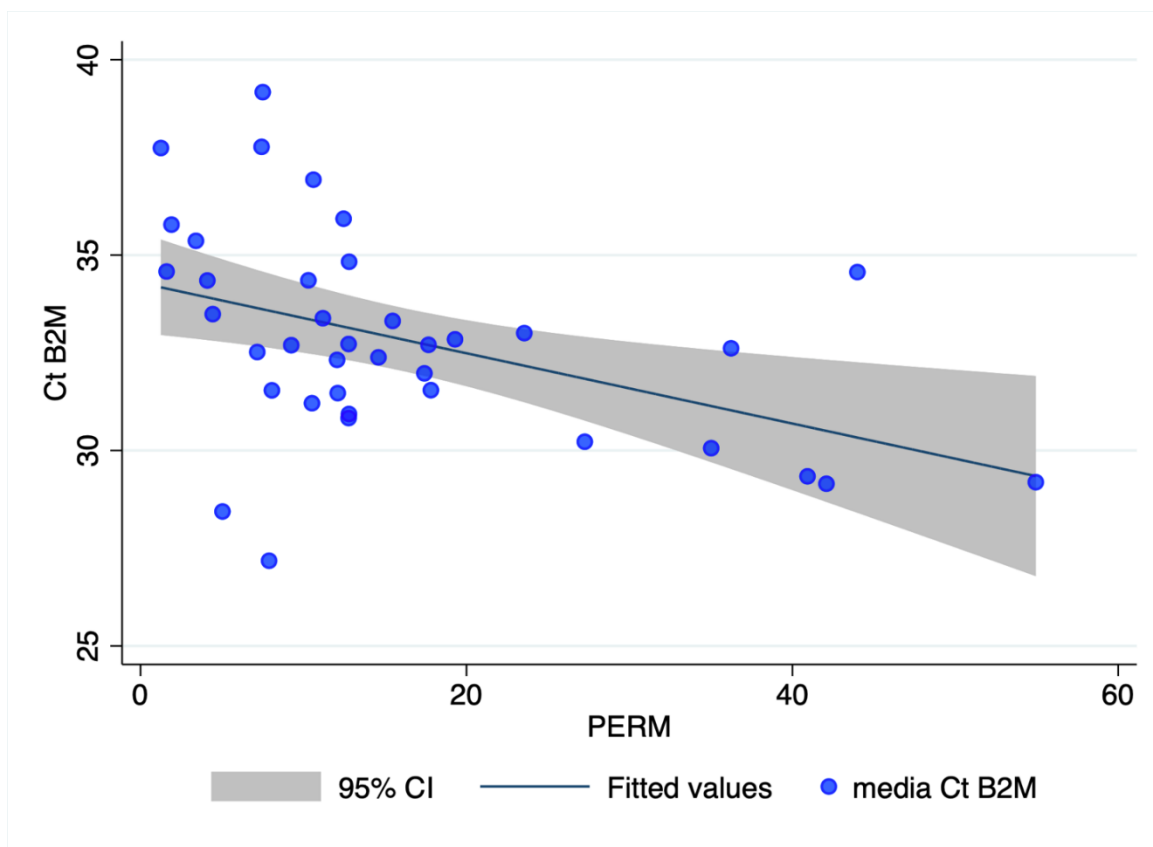


Fig. 4.10 Scatter plot e retta di regressione fra l'espressione del gene B2M come media dei cicli soglia rilevati alla real time PCR e la metrica PERM

I valori di espressione, in termini di valore soglia medio fra le repliche, per ogni gene housekeeping in esame sono stati relazionati con la quantità di frammenti rilevate nelle 6 regioni definite al paragrafo 4.4. La presenza di frammenti nelle regioni 1, 2 e 3, con sequenze fra le 25 e 75 basi, fra 76 e 100 basi e fra 101 e 150 basi, non è risultata correlata in base al test dei ranghi di Spearman, a nessun gene esaminato. Si è iniziato a vedere una correlazione significativa a partire dalla regione 4, con sequenze fra 151 e 200 basi. In tale regione vi è una

correlazione con PPIB ( $p = 0,04$ ,  $\rho = -0,31$ ), con la beta 2 microglobulina ( $p = 0,009$ ,  $\rho = -0,42$ ), ma non con GAPDH ( $p = 0,1$ ,  $\rho = -0,241$ ) e Beta Actina ( $p = 0,3$ ,  $\rho = -0,262$ ). Le correlazioni significative sono illustrate in Figura 4.11. Tali risultati non sono ragionevolmente da attribuire alla lunghezza degli ampliconi, in quanto erano compresi tutti fra le 74 e 97 basi

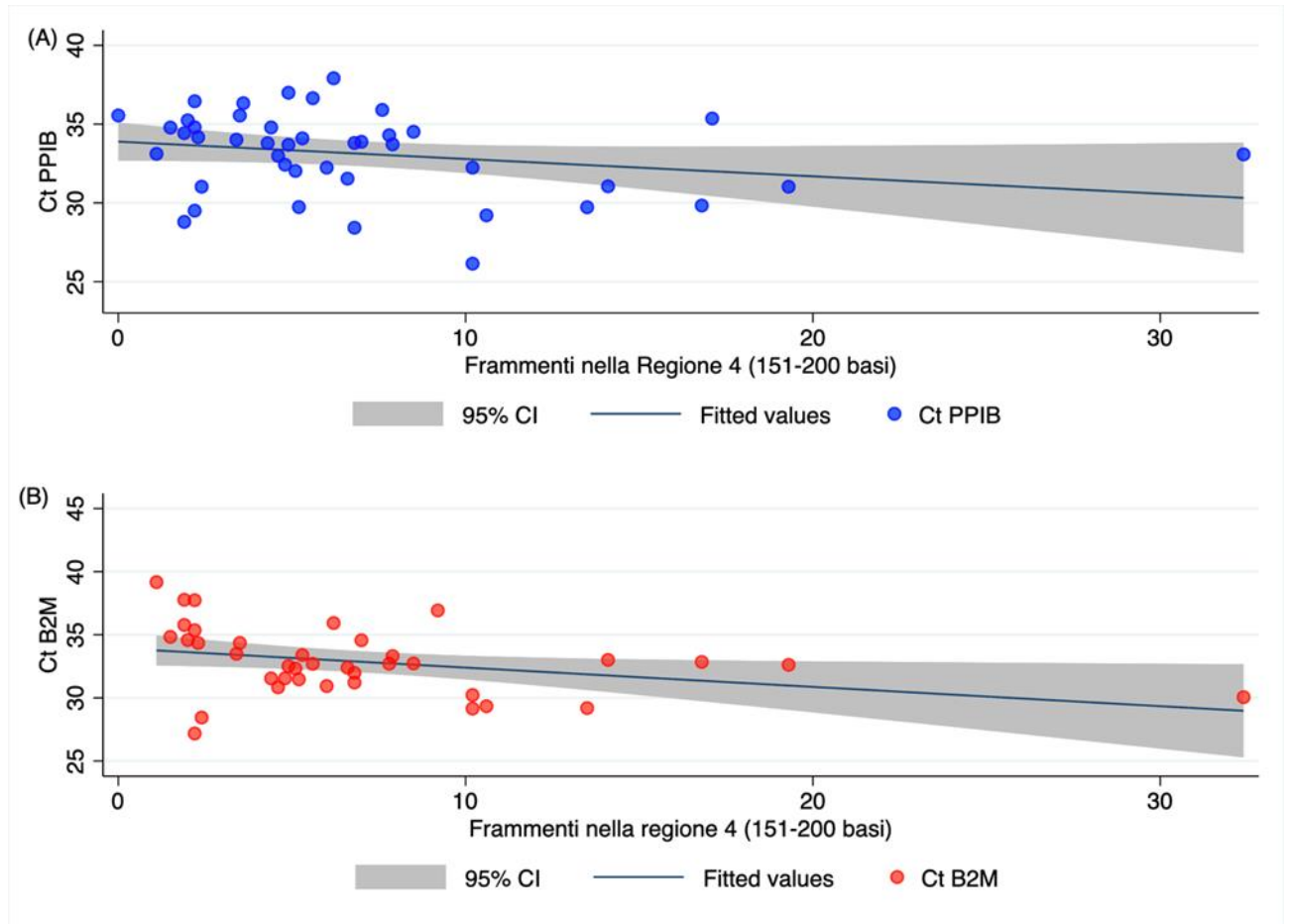


Fig. 4.11 Scatter plot e retta di regressione fra l'espressione del gene PPIB (A) e Beta 2 Microglobulina (B) come media dei cicli soglia rilevati alla Real Time PCR e i frammenti registrati all'Agilent BioAnalyzer nella regione 4 (151-200 basi).

I dati riportati in Figura 4.11 sono stati confermati anche dalla regressione lineare solo per B2M ( $p = 0,03$   $R^2 = 0,117$ ), ma non per PPIB ( $p = 0,1$   $R^2 = 0,063$ ). Per la regione 5, comprendente frammenti da 201 a 250 basi, solo i valori di espressione della Beta 2 Microglobulina sono risultati correlati alla

quantità di frammenti in essa registrati ( $p = 0,008$ ,  $\rho = -0,424$ ). Anche in questo caso il dato è stato confermato dalla regressione lineare ( $p = 0,03$ ,  $R^2 = 0,123$ ) come illustrato in Figura 4.12.

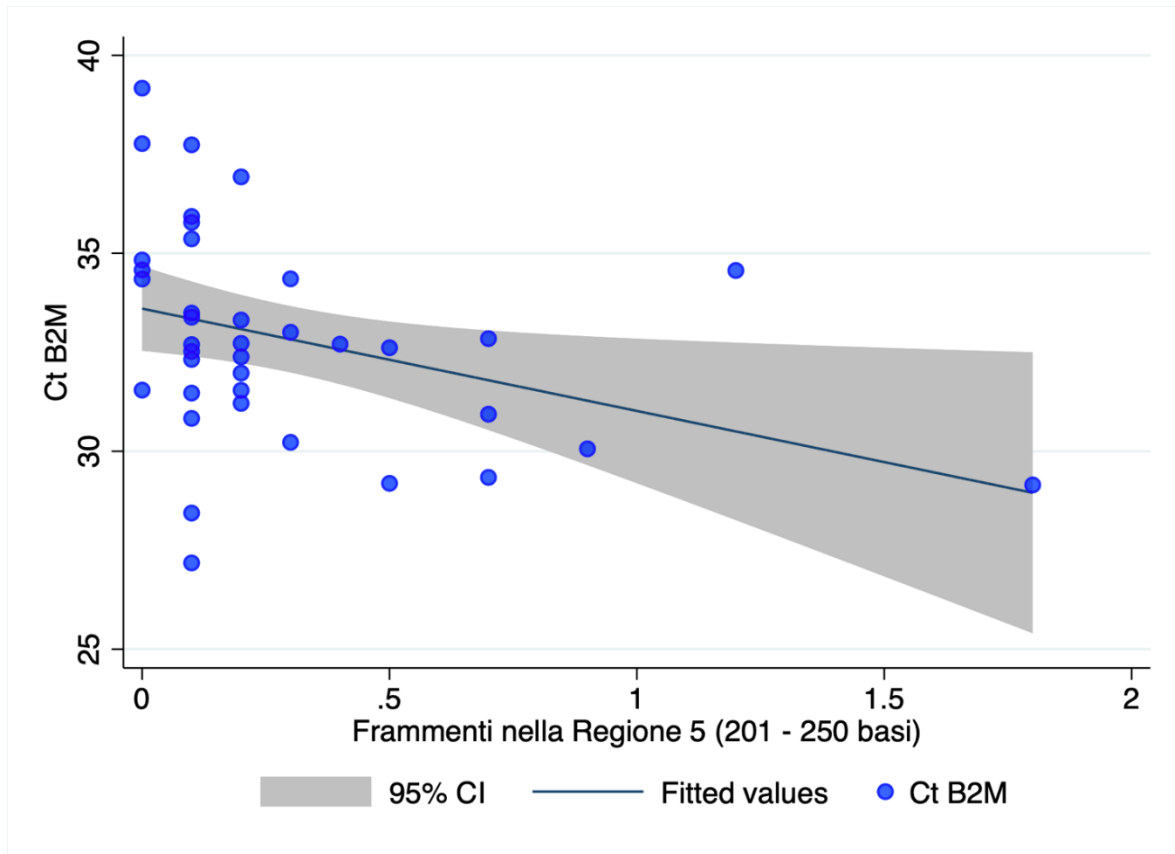


Fig. 4.12 Scatter plot e retta di regressione fra l'espressione del gene beta 2 microglobulina (B) come media dei cicli soglia rilevati alla real time PCR e i frammenti registrati all'Agilent BioAnalyzer nella regione 4 (201 - 250 basi).

Per l'ultima regione in esame, comprendente frammenti dalle 251 alle 300 basi, non si sono evidenziate correlazioni con alcun gene in esame. Tale risultato è verosimilmente dovuto all'esigua quantità di valori disponibili per tale regione. Ciò comunque è del tutto atteso trattandosi di RNA proveniente da tessuti autoptici fissati in formalina ed inclusi in paraffina che notoriamente sono caratterizzati da un'elevata degradazione delle biomolecole.

## CAPITOLO QUINTO

### Conclusioni

I tessuti autoptici routinari, sia congelati che fissati in formalina e inclusi in paraffina, sono caratterizzati da biomolecole altamente degradate, a causa del processo di autolisi e dell'attività microbica durante l'intervallo di post mortem. Fra le biomolecole, l'RNA è una molecola estremamente labile; conseguentemente, il suo livello di degradazione può fungere da “marcatore” per la qualità complessiva del campione e per valutare quindi l'idoneità del campione per analisi genomiche, proteomiche e trascrittomiche. In questo lavoro di tesi, gli RNA ottenuti da campioni cerebrali autoptici di soggetti deceduti per trauma cranico nonché per altre cause di morte (campione di controllo) sono stati sottoposti ad analisi di qualità degli RNA basate su elettroforesi microfluidica (Agilent BioAnalyzer). Dagli elettroferogrammi ottenuti da tale analisi, quindi, sono stati considerati non solo il RIN, ma anche altre due metriche per valutare la qualità degli RNA: il PERM e l'analisi dei frammenti. Inoltre, è stata usata allestita la RT-PCR per diversi geni housekeeping.

I nostri risultati hanno evidenziato che dai casi si sono ottenute quantità inferiori di RNA rispetto ai controlli. Inoltre, la lunghezza dei frammenti nella regione 5 (201-250 basi) è risultata significativamente più popolata nei controlli rispetto ai casi. Questo risultato può avere molteplici spiegazioni: il diverso intervallo di post mortem fra casi e controlli, il diverso tempo di fissazione dei campioni esaminati come anche l'età del blocchetto di tessuto fissato e incluso in termini di anno in cui è stato processato. Purtroppo, le analisi svolte non ci consentono di fare ulteriori possibili ipotesi, sebbene –mediamente- i controlli



siano stati processati in tempi più recenti rispetto ai casi. La possibilità del diverso intervallo di post mortem non è stata affrontata in tale studio, ma lo potrebbe divenire mediante particolari studi di espressione genica. Recentemente, infatti, è stato dimostrato che specifici dati di espressione genica post mortem possono essere utilizzati come biomarcatori per stimare l'intervallo post mortem (5).

I nostri risultati, in accordo con altri autori, hanno confermato che la metrica RIN non è un sistema adatto per valutare la qualità degli RNA isolati da materiale fissato in formalina e incluso in paraffina (1, 4), a maggior ragione se questo è di origine autoptica. La metrica PERM e l'analisi dei frammenti, al contrario, sono certamente metodi più accurati del RIN e più adatti alla valutazione della qualità degli RNA da tessuti d'archivio, anche di origine autoptica.

Dall'analisi di espressione dei geni housekeeping è emerso che -in particolare- la Beta 2 Microglobulina è il gene che maggiormente correla con la qualità degli RNA da metriche elettroforetiche. Si evince, infatti, che l'amplificabilità della B2M è legata sia alla metrica PERM che alla analisi dei frammenti della regione 4 e della regione 5. Questo risultato, quindi, potrebbe indicare che -nei tessuti autoptici d'archivio- la presenza di frammenti rilevabili elettroforeticamente fra 151 e 250 basi è un indice di qualità che rende idoneo il campione ad essere processato mediante RT-PCR (con lunghezza degli ampliconi intorno alle 70-80 basi). La reale utilizzabilità di questo "marcatore" deve essere tuttavia confermata da un campione più numeroso.

## References

1. Chung, J.Y.; Cho, H.; Hewitt, S.M. The paraffin-embedded RNA metric (PERM) for RNA isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Biotechniques* 2016, *60*, 239-244, doi:10.2144/000114415.
2. Nardon, E.; Donada, M.; Bonin, S.; Dotti, I.; Stanta, G. Higher random oligo concentration improves reverse transcription yield of cDNA from bioptic tissues and quantitative RT-PCR reliability. *Experimental and molecular pathology* 2009, *87*, 146-151.
3. Jonathan Houseley 1, David Tollervey. The many pathways of RNA degradation. *Cell Press*. 2009 Feb 20;136(4):763-76.
4. A. Alrafiah, R. Alshali. The effect of prolonged formalin fixation on the staining characteristics of archival human brain tissue. *Folia Morphol (Warsz)*. 2019;78(2):230-236.
5. W. Jones, S. Greytak, H. Odeh, P. Guan, J. Powers, J. Bavarva, H. M. Moore. Deleterious effects of formalin-fixation and delays to fixation on RNA and miRNA-Seq profiles. *Nature Publishing Group*. 2019 May 6;9(1):6980.
6. Sanchez I, Betsou F, Culot B, Frاسquilho S, McKay SC, Pericleous S, et al. RNA and microRNA Stability in PAXgene-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Blocks After Seven Years' Storage. *Am J Clin Pathol*. 2018;149(6):536-47.
7. Bonin S, Hlubek F, Benhattar J, Denkert C, Dietel M, Fernandez PL, et al. Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch*. 2010;457(3):309-17.
8. Bjorkman J, Svec D, Lott E, Kubista M, Sjoback R. Differential amplicons (DeltaAmp)-a new molecular method to assess RNA integrity. *Biomol Detect Quantif*. 2016;6:4-12.
9. Antiga LG, Sibbens L, Abakkouy Y, Decorte R, Van Den Bogaert W, Van de Voorde W, et al. Cell survival and DNA damage repair are promoted in the human blood thanatotranscriptome shortly after death. *Sci Rep*. 2021;11(1):16585.