



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**Valutazione di nuovi marcatori molecolari
per la stima del *post mortem interval***

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa
Chiara Turchi

Tesi di Laurea di
Francesca Giulioni

Correlatore:
Dott.ssa
Federica Alessandrini

A.A. 2020/2021

A mio zio Francesco

"Guarderai le stelle, la notte ... La mia stella sarà per te una delle stelle ... visto che io abiterò in una di esse, visto che io riderò in una di esse, allora sarà per te come se tutte le stelle ridessero ... Avrai voglia di ridere con me ... E i tuoi amici saranno stupiti di vederti ridere guardando il cielo ... Sarà come se t'avessi dato, invece delle stelle, mucchi di sonagli che sanno ridere..."

(A.de Saint-Exupéry, Il Piccolo Principe)

INDICE

Capitolo Primo: INTRODUZIONE

1.1 Il *post mortem interval* (PMI)

1.1 Metodi attuali di stima del PMI

1.2.1 Stima del PMI precoce

1.2.2 Stima del PMI tardivo

1.3 La degradazione dell'RNA per la stima del PMI

1.4 I microRNA (miRNA)

1.4.1 Gli studi sui microRNA nei fluidi biologici umani per la stima del PMI

1.5 Scopo della tesi

Capitolo Secondo: TECNICHE DI ANALISI

2.1 Estrazione dell'RNA

2.2 Preparazione dei cDNA *templates*

2.3 Real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Capitolo Terzo: MATERIALI E METODI

3.1 Campioni

3.2 Protocollo di estrazione dell'RNA da umor vitreo con *MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems)*

3.3 Protocollo di estrazione dell'RNA da sangue intero con *MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems)*

3.4 Protocollo di preparazione dei cDNA *templates* con *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems)*

3.5 Protocollo di Real-time RT-PCR con *TaqMan® Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems)*

3.6 Analisi dei dati

Capitolo Quarto: RISULTATI E DISCUSSIONE

BIBLIOGRAFIA

RINGRAZIAMENTI

Capitolo Primo

INTRODUZIONE

1.1 Il *post mortem interval* (PMI)

Il *post mortem interval* (PMI), o *time since death* (TSD), è il lasso di tempo che intercorre tra il momento del decesso ed il rinvenimento del cadavere. La determinazione di questo intervallo temporale, di cruciale importanza nei procedimenti giudiziari, è diagnosi tanto più difficile quanto più esso aumenta [Cattaneo, Grandi, 2004] e rappresenta una delle maggiori sfide che si trova ad affrontare il patologo forense.

L'intervallo *post mortem* viene tradizionalmente classificato in fasi immediate, precoci e tardive (*immediate PMI*, *early PMI* e *late PMI*) [Shrestha et al, 2021]:

- I. L'*immediate PMI* è il lasso di tempo, compreso tra le due e le tre ore dal decesso, che intercorre tra la morte somatica e quella cellulare. Si caratterizza per rapidi cambiamenti a carico del corpo, causati dalla mancata circolazione del sangue e dalla perdita dei meccanismi regolatori. A questi cambiamenti biochimici e fisiologici, rilevabili principalmente a livello oculare e cutaneo, non corrispondono ancora fattive modificazioni morfologiche e cellulari riscontrabili all'analisi istochimica. Negli occhi si osservano l'opacizzazione della cornea e la segmentazione dei vasi sanguigni della retina, oltre alla drastica diminuzione, fino alla totale scomparsa, della pressione intraoculare. La pelle appare pallida e perde di elasticità e lucentezza.
- II. L'*early PMI*, dalle tre alle settantadue ore dal decesso, rappresenta la prima vera e propria fase *post mortem* e risulta essere il momento di maggiore interesse medico-legale, in quanto maggiormente rilevante per stabilire la linea temporale degli eventi e sviluppare una teoria sulle possibili circostanze della morte [Shrestha et al, 2021]. È caratterizzato dal rapido susseguirsi di numerosi processi che iniziano in momenti diversi nel corpo e che conducono a trasformazioni fisiche e fisico-

chimiche ben evidenti, come il raffreddamento corporeo, l'ipostasi e la rigidità cadaverica. Ad essi possono associarsi fenomeni più tipici del periodo tardivo, come l'autolisi ed i processi metabolici e putrefattivi, che possono avviarsi nel cadavere già a partire dalle ventiquattro ore successive al decesso, specialmente in condizioni climatiche, ambientali e soggettive specifiche.

- III. Il *late PMI* coincide con l'inizio della disgregazione del tessuto corporeo, operata da parte dei microrganismi e degli enzimi presenti, sia umani che batterici, e può prendere avvio già dopo ventiquattro ore dal decesso oppure molto più tardivamente, fino a sette giorni dopo. Questa fase è caratterizzata da alterazioni trasformative dei tessuti molli riconducibili principalmente alla decomposizione, o putrefazione, del cadavere, la quale procede secondo stadi successivi (stadi cromatico, enfisematoso e colliquativo) e lungo un lasso di tempo estremamente variabile, fino alla scheletrizzazione, cioè l'ultimo stadio putrefattivo, che consiste nella perdita dei tessuti molli. In particolari ambienti e condizioni possono intervenire altre modalità trasformative, quali la mummificazione, in ambienti molto asciutti ed estremamente caldi o freddi, la corificazione, in ambienti chiusi, come le casse metalliche, o molto umidi, e la saponificazione, in acqua fredda e con scarsa presenza di ossigeno. Questi fenomeni cadaverici vengono anche definiti conservativi, in quanto rallentano o impediscono la riduzione scheletrica, conservando, appunto, i tessuti, i quali risultano, però, in qualche modo alterati. La tarda fase *post mortem* risulta, dunque, generalmente dipendente da numerosi parametri sia intrinseci al cadavere (peso, muscolatura, stato di salute in vita) che estrinseci (temperatura ambientale, ventilazione, presenza di micro e macrofauna, ubicazione del corpo, eventuale abbigliamento).

1.2 Metodi attuali di stima del PMI

La patologia forense si avvale di diversi metodi per stimare il *post mortem interval*. L'epoca della morte può essere determinata attraverso l'analisi di alcune caratteristiche fisiche,

fisico-chimiche e biochimiche, particolarmente utili per i PMI precoci, ma pressoché inutilizzabili per quelli tardivi, per i quali si ricorre solitamente a valutazioni dello stato di decomposizione del cadavere. Sebbene i vari metodi, integrandosi tra loro, siano in grado di ridurre il tasso di errore intrinseco di ciascun diverso approccio, ancora nessuno di essi, né nessun dato integrato, riesce a fornire con certezza l'ora reale del decesso, potendosi ottenere, quindi, solo un orario approssimativo. La variabilità della stima del PMI dipende, tuttavia, non solo dall'imprecisione dei diversi metodi, ma anche dall'influenza di variabili endogene ed esogene sulla conservazione del corpo. Ne sono stati proposti di nuovi, come, ad esempio, la spettroscopia di risonanza magnetica per cercare di estrapolare il PMI da tessuti decomposti; in modo particolare, grazie ai continui miglioramenti delle tecniche di biologia molecolare, la valutazione del livello di degradazione di proteine ed acidi nucleici, specialmente RNA e microRNA, insieme ai modelli circadiani di espressione genica, sembrano presentare delle grandi potenzialità nelle indagini sul *post mortem interval*.

1.2.1 Stima del PMI precoce

Il *post mortem interval* precoce viene stimato *in primis* attraverso la valutazione dei parametri abiotici consecutivi o tanatologici classici dell'*algor*, *livor* e *rigor mortis*:

- I. L'*algor mortis* consiste nel raffreddamento del cadavere rispetto alla temperatura ambientale ed è dovuto alla mancata regolazione omeostatica da parte dell'ipotalamo, in concomitanza con la perdita di calore nell'ambiente per conduzione, convezione e irraggiamento [Shrestha et al, 2021]. Non esiste una proporzionalità lineare tra il tempo trascorso ed il raffreddamento cadaverico, tanto che la curva del decremento termico procede secondo un andamento sigmoide, descrivendo tre periodi caratterizzati da lunghezza relativa, di cui soltanto quello centrale presenta una caduta ripida (tipicamente -1°C all'ora), accompagnandosi a variazioni più gradualmente durante le prime ore dal decesso e durante quelle più prossime all'allineamento della temperatura corporea con quella ambientale, quando iniziano i fenomeni putrefattivi. L'*algor mortis* risulta influenzato da diversi fattori intrinseci ed estrinseci. Tra i fattori estrinseci si

ricordano: la temperatura esterna, mai costante, e l'eventuale presenza di indumenti; tra i fattori intrinseci, invece, si riscontrano sia la temperatura originaria del corpo prima del decesso (un'eventuale sindrome febbrile in atto), ma anche l'entità del pannicolo adiposo del soggetto. Sono stati formulati diversi metodi matematici al fine di stabilire l'orario di morte in base all'*algor*, come il metodo dei nomogrammi di Henßge – Madea, che non risultano, però, applicabili in particolari condizioni climatiche ed ambientali e specialmente quando il luogo del ritrovamento del corpo non coincida con quello del decesso.

- II. Il *livor mortis* è la decolorazione della salma causata dalla raccolta di sangue, per effetto della gravità, nelle parti più declivi del corpo, in conseguenza della cessazione dell'attività cardiaca. È caratterizzato dalla comparsa di macchie ipostatiche, inizialmente mobili e di colore rosso-vinoso, che, col trascorrere delle ore, a causa della disgregazione delle cellule ematiche e della fuoriuscita di emoglobina dagli eritrociti, diventano fisse. Il successivo cambiamento di colore delle ipostasi, da rosso-vinoso a verdastre, dipende dall'influenza e dall'avanzare dei processi putrefattivi. La velocità con cui il *livor* si presenta dipende anche dalla temperatura, per cui compare prima a temperature più elevate; essa può, tuttavia, essere influenzata anche della corporatura del soggetto, dalla posizione del corpo e dalla causa del decesso. Benché sia attualmente possibile valutare il *livor* prima della comparsa dei segni di putrefazione attraverso metodi quantitativi colorimetrici, una standardizzazione risulta ancora impossibile, anche a causa della ridistribuzione delle lividure nel caso in cui il corpo venga spostato, girato o toccato durante le prime 10-12 ore dalla morte.
- III. Il *rigor mortis* consiste nell'irrigidimento delle fibre muscolari del cadavere per un meccanismo di pseudo-contrazione, causato dall'esaurimento dell'adenosina trifosfato (ATP) nei muscoli in seguito alla mancanza di ossigeno e alla conseguente interruzione della respirazione cellulare aerobica. L'assenza di ATP impedisce la rottura dei legami covalenti che si instaurano tra le componenti della fibra muscolare, l'actina e la miosina, e che originano la contrazione. L'irrigidimento segue ad una breve fase iniziale di flaccidità, sviluppandosi contemporaneamente

in tutto il tessuto muscolare corporeo, sia volontario che involontario, ma si manifesta prima a livello dei muscoli più piccoli, come quelli del viso intorno a occhi e bocca, circa due-tre ore dopo la morte, quindi a livello delle mani e degli arti superiori e infine nei grandi muscoli degli arti inferiori; la diffusione del rigor in senso cranio-caudale segue la c.d. Legge di Nysten. La rigidità si presenta massima dopo 36-48 ore, per risolversi completamente dopo 72 ore, quando il complesso di acto-miosina che manteneva la contrazione inizia a disgregarsi a causa della proteolisi. Questo fenomeno cadaverico risulta influenzato sia dalla temperatura ambientale, comparso in ritardo alle basse temperature e risolvendosi più rapidamente alle alte, sia dal grado di sviluppo muscolare dell'individuo, che dalla causa stessa di morte.

Per posizionare l'epoca della morte in un contesto temporale possono essere utili anche lo studio del contenuto gastrico, la valutazione dell'opacamento corneale e l'esame della distribuzione/estensione dei fenomeni putrefattivi. Quando necessario, anche sofisticate indagini entomologiche forensi possono fornire dati significativi. Durante le prime ore dal decesso, è possibile valutare anche alcune reazioni di sopravvitalità, le quali vengono a determinarsi nei tessuti corporei finché si protrae il metabolismo cellulare, grazie ad una certa quota di energia residua, inducendo lo stato di eccitazione *post mortem* in risposta ad alcuni stimoli esterni. Attualmente, per stimare il PMI, vengono utilizzati stimoli chimici, meccanici ed elettrici a carico dei muscoli del viso, di quelli scheletrici e dei muscoli lisci dell'iride, valutandone la contrattilità in modo quantitativo. L'eccitazione persiste per tempi diversi in gruppi muscolari diversi ma risulta generalmente accettata la teoria che dopo 12-13 ore la risposta scompaia.

Ai fini pratici, non c'è ancora stata una vera svolta, invece, nella stima dell'ora della morte attraverso metodi chimici; ciò è dovuto principalmente ai processi metabolici, autolitici e putrefattivi sottostanti [Madea, 2016], da cui deriva una variabilità interindividuale tale da impedire la standardizzazione dell'analisi per la determinazione del PMI, anche precoce. Nel campo emergente della tanatochimica, la maggior parte dei metodi misura le variazioni di concentrazione degli elettroliti indotta dall'autolisi, come, ad esempio, l'aumento di

potassio e la diminuzione di sodio e di cloruro nei liquidi extracellulari, soprattutto nell'umor vitreo. In quest'ultimo, infatti, che si trova in un sito maggiormente protetto dall'azione batterica e dall'interazione chimica con i prodotti del *breakdown* cellulare, i gradienti di concentrazione perdurano a lungo, fino a 120 ore dal decesso. Il sangue, invece, interessato da un'autolisi troppo rapida, non si rivela un campione utile al calcolo del PMI. Il parametro biochimico più indagato, anche se ancora raramente utilizzato come prova giudiziaria, è l'incremento *post mortem* della concentrazione di potassio nell'umor vitreo. La concentrazione dell'analita aumenta all'aumentare del PMI secondo una relazione non del tutto lineare e una variabilità residua non costante, risentendo in modo particolare della temperatura ambientale e dello stato di salute del soggetto, come nel caso degli affetti da patologie croniche pregresse.

1.2.2 Stima del PMI tardivo

Il PMI tardivo può essere stimato, accanto alla valutazione, anche microbiologica, dei tessuti decomposti, principalmente attraverso l'analisi entomologica e/o botanico-palinologica forense. Se l'entomologia forense può essere utilizzata anche in sede di stima di PMI precoci, ad integrazione dei metodi più classici, essa può rappresentare in molti casi il solo metodo utile a stimare l'intervallo *post mortem*, fino a diverse settimane o anche mesi prima del decesso, in presenza di decomposizione avanzata. L'approccio entomologico valuta la composizione della colonia degli insetti, poiché specie differenti infestano un corpo in momenti differenti, e l'età dei più vecchi stadi immaturi (uova, larve o pupe) dei necrofagi, permettendo di risalire al momento in cui essi hanno colonizzato il corpo. Ne deriva che il risultato non sarà sovrapponibile al *post mortem interval*, ma piuttosto al momento della deposizione delle uova [Cattaneo, Grandi, 2004], che può essere anticipato, in caso di necrosi, o posticipato, qualora le condizioni ambientali risultino sfavorevoli agli insetti, la cui presenza, ovideposizione e sviluppo dipendono *in primis* dalla facilità di accesso al cadavere e dalla temperatura. A rivestire particolare importanza sono le mosche carnarie, i primi insetti a colonizzare il cadavere, essendo il loro ciclo vitale intimamente legato alla carne decomposta; successivamente il corpo in putrefazione attrae una serie di insetti non soltanto necrofagi, ma anche predatori di questi ultimi e onnivori. I

resti scheletrici pongono ovviamente dei problemi di datazione ancora più rilevanti, dei quali si occupa l'antropologia forense.

1.3 La degradazione dell'RNA per la stima del PMI

L'analisi della degradazione tempo-dipendente delle macromolecole è diventata un punto focale nella scienza forense [Maiese et al, 2021]. In modo particolare, da alcuni anni c'è molta attenzione verso l'RNA come possibile marcatore del PMI, dato che, da questo punto di vista, sembrerebbe risultare più accurato di DNA e proteine. La degradazione del DNA per determinare il *post mortem interval* è considerata, infatti, di limitato valore nelle indagini forensi, in quanto risulta efficace solo per stime di brevi PMI, mentre, se il tasso di degradazione di alcune proteine specifiche risulta essere in notevole correlazione con il PMI, esso è anche influenzato dalla temperatura ambientale e dalla putrefazione batterica. L'RNA manifesta, invece, dopo la morte dell'organismo, degradazione e perdita di trascritti in tempi relativamente rapidi, ma comunque ancora adatti alla stima del PMI, e l'evidenza mostra che un *time since death* più lungo è normalmente correlato alla diminuzione dei livelli di trascrizione. Grazie ai progressi raggiunti nel campo delle tecniche molecolari, soprattutto nell'ambito della quantificazione genica in qRT-PCR, e dopo lo studio di Bauer del 2007, che apriva all'uso pratico delle tecniche dell'RNA nelle scienze forensi, le possibilità offerte dall'acido ribonucleico sono state ampiamente rivalutate. La generale convinzione precedente lo vedeva, infatti, troppo rapidamente degradabile, e quindi pressoché inutilizzabile per l'analisi forense, a causa della sua natura molecolare instabile e della sua suscettibilità all'azione delle ribonucleasi, accanto alle oggettive difficoltà dell'epoca legate alla sua estrazione e alla sua valutazione in elettroforesi. Bauer, e dopo di lui, Vennemann e Koppelkamm nel 2010, hanno osservato, invece, la stabilità dell'RNA *post mortem* fino a 96 ore nel cervello, nel cuore e in generale nei tessuti non particolarmente ricchi di ribonucleasi endogene. Essi hanno anche illustrato come tale stabilità risulti influenzata, oltre che dal tipo di campione e dall'azione delle RNAsi umane e batteriche, anche da altri fattori, sia esterni, che interni *ante mortem*: elevata temperatura ambientale, luce solare, umidità, causa di morte, fattori agonici (coma

terminale, ipossia), piressia, disidratazione, alcuni tipi di farmaci, sesso ed età. Tuttavia, gli effetti di condizioni ambientali mutevoli non sono stati finora valutati in modo approfondito. Nel corso degli anni sono state esaminate diverse specie di RNA per la determinazione del PMI, tra cui gli RNA messaggeri (mRNA), gli RNA ribosomiali (rRNA) e i microRNA (miRNA), ed è attualmente disponibile un'ampia gamma di kit commerciali per l'analisi in Real-time RT-PCR, che è considerata il metodo di scelta obbligatoria, grazie alla sua elevata sensibilità [Maiese et al, 2021]. Tuttavia, l'elevata precisione quantitativa di questa tecnica può rivelarsi un'arma a doppio taglio, rischiando di condurre ad un'errata interpretazione dei dati, in quanto minimi cambiamenti nei livelli di mRNA dovuti all'elaborazione del campione potrebbero essere erroneamente interpretati come variazioni nell'espressione genica. Risulta dunque assolutamente necessaria la normalizzazione dei dati attraverso l'uso di geni endogeni di controllo. Non essendo possibile utilizzare i *reference* usati di routine negli studi biochimici (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, β -actina, RPS-29 e IL-1 β), che si degradano nel tempo, in particolare alle alte temperature, è stato proposto il possibile utilizzo dei microRNA. Le caratteristiche intrinseche di queste piccole molecole e la loro resistenza alla degradazione li rendono, infatti, adatti come geni *housekeeping* di controllo. Permangono ancora alcune limitazioni riguardo l'utilizzo degli RNA per la stima del PMI, soprattutto in fasi avanzate, tra cui la mancanza di procedure standardizzate per la raccolta e l'analisi dei campioni e la scarsità di studi umani, essendo stati finora valutati in larga parte modelli murini. Il tasso di degradazione dell'RNA non varia soltanto a livello dei diversi tessuti, in base alla ricchezza di ribonucleasi intracellulari e a seconda che siano più o meno esposti alle condizioni ambientali, ma anche in organismi diversi, come il ratto e l'essere umano. Il modello matematico multiparametrico animale, proposto da diversi studi recenti, appare al momento promettente anche per i campioni umani, anche se risultano necessarie ulteriori e più ampie indagini per verificarne l'effettiva applicabilità nell'uomo.

1.4 I microRNA (miRNA)

I microRNA (miRNA) sono una classe di piccoli RNA riboregolatori non codificanti a singolo filamento, composti da 20-24 nucleotidi, che risultano ben conservati negli organismi eucarioti; si stima che rappresentino quasi l'1% della totalità del genoma, anche se ad oggi ne sono stati scoperti soltanto poche migliaia. Il 50% di essi risulta intragenici, di cui la maggior parte si trova all'interno di introni di geni codificanti, mentre il restante 50% è rappresentato da unità trascrizionali indipendenti, dotate di un promotore proprio. Vengono trascritti nel nucleo cellulare dalla RNA polimerasi II e originano da un precursore *pri-miRNA* a *stem-loop*, lungo 100-1000 nucleotidi, attraverso tre fasi di maturazione (*cropping*, *export*, *dicing*), in seguito alle quali si forma un duplex miR nel citoplasma e, da questo, il miRNA maturo (talvolta due, con target diversi), che entra nel complesso effetore proteico (*RISC*, complesso di silenziamento indotto da RNA) o miRgonauta, il quale media la degradazione dell'mRNA target oppure l'inibizione della successiva traduzione del gene (Fig.1).

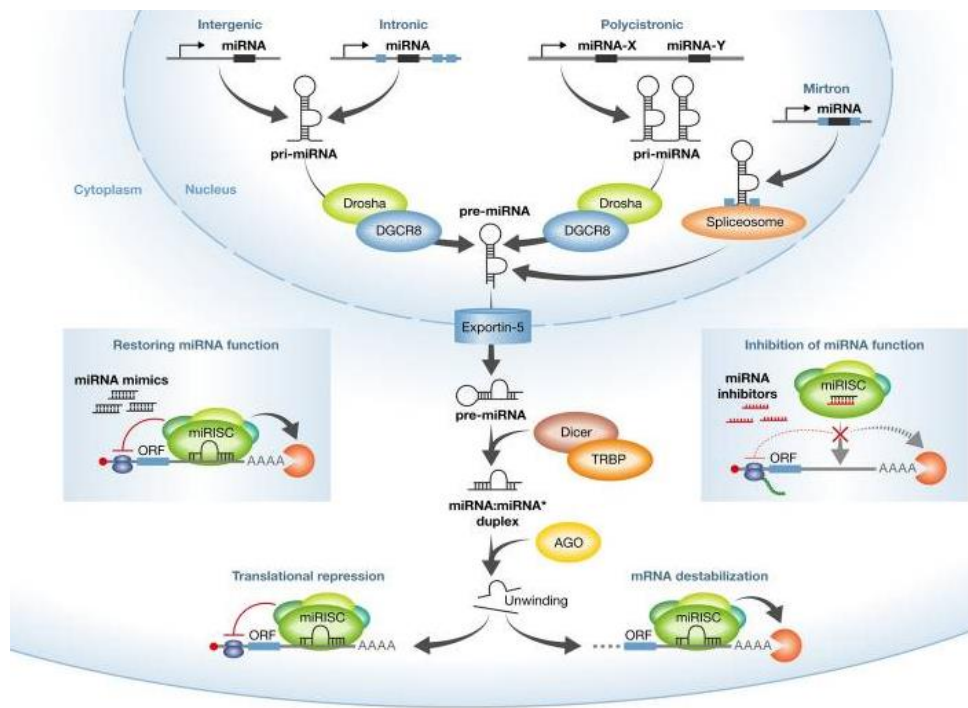


Fig.1: Il processo di maturazione dei microRNA

I miRNA hanno un ruolo importante nella regolazione in senso negativo dell'espressione genica a livello post-trascrizionale (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS). Attraverso l'appaiamento delle basi nel 3'UTR dell'mRNA target, essi regolano negativamente molteplici mRNA bersaglio, silenziando, di conseguenza, un vasto numero di geni. La funzione di molti microRNA non è ancora nota, ma sono stati dimostrati meccanismi di inattivazione o attivazione dei miRNA, con la partecipazione a processi sia fisiologici che patologici, riscontrandone un ruolo in proliferazione, apoptosi e differenziazione cellulare, con un coinvolgimento, in seguito alla loro deregolazione, in svariate malattie umane cardiovascolari, neurodegenerative e soprattutto neoplastiche. Si tratta di molecole prevalentemente intracellulari, anche se miRNA circolanti sono stati scoperti in alcuni fluidi biologici (plasma, liquido cerebrospinale, lacrime, saliva), dove risultano inaspettatamente stabili, in quanto "impacchettati" da *carriers* che li proteggono dalle esonucleasi presenti nei fluidi extracellulari stessi.

Negli ultimi anni, i micro-RNA sono stati molto studiati, oltre che in ambito clinico, anche in quello forense, in virtù di alcune loro peculiari caratteristiche, in modo particolare l'espressione tessuto-specifica e la maggiore resistenza alla degradazione rispetto all'mRNA e alle altre macromolecole, risultando molto stabili anche in condizioni estreme di temperature e di pH e durante i trattamenti chimici. Sebbene siano state ipotizzati diversi potenziali impieghi forensi dei miRNA, tra cui la stima del *post mortem interval*, la loro applicazione pratica trova ancora vari ostacoli, a causa dei diversi problemi metodologici emersi, come l'assenza di standardizzazione e convalida, in gran parte coincidenti con quelli che riguardano l'uso forense dell'RNA in generale. Il primo suggerimento della potenziale implicazione dei miRNA in questo campo è venuto da Hanson nel 2009, che ne ha valutato l'utilizzo come biomarcatori altamente sensibili nell'identificazione di fluidi corporei nelle tracce biologiche. Nell'ambito delle indagini sul PMI, le già citate caratteristiche intrinseche dei microRNA li rendono adatti sia come geni *housekeeping* di controllo, all'interno di un modello matematico che confronti, in tessuti specifici, molecole caratterizzate da velocità di degradazione note e concentrazioni di miRNA [Maiese et al, 2021], che come target stesso dell'analisi per la determinazione del PMI anche tardivo, in ragione della loro stabilità. È stato, infatti, dimostrato che i microRNA sono stabili, in tessuti diversi di ratto,

fino a 120 ore dopo la morte, prima che i loro livelli inizino lentamente a diminuire. Inoltre, alcuni di essi sembrano correlarsi all'intensità della luce ambientale e/o al ritmo circadiano, motivo per cui l'analisi del microRNA potrebbe rivelarsi utile a stimare alcune condizioni ambientali al momento della morte. I miRNA sembrano, infatti, avere un ruolo chiave nel mantenimento, attraverso una fine regolazione post-trascrizionale dei *core clock genes* e dei *clock-controlled genes*, del ritmo endogeno circadiano (Fig.2), che consente agli esseri umani di adattarsi agli stimoli ambientali ciclici (luce/buio) attraverso un “orologio principale” nel cervello e un controllo periferico nei tessuti, a coordinare la cronobiologia del corpo [Corradini et al, 2015].



Fig.2: Il ritmo circadiano convenzionale

Così come per l'RNA, la maggior parte degli studi si è occupata di modelli animali, in particolare murini, con solo pochissime eccezioni concernenti l'uso di campioni autoptici umani; da questo punto di vista, sono stati studiati soprattutto i tessuti solidi,

principalmente il miocardio ed il cervello. Questa mancanza di dati umani rappresenta sicuramente una delle più grandi limitazioni per l'utilizzo forense dei miRNA per la stima del PMI, derivandone *in primis* l'impossibilità di selezionare, al momento, e data la tessuto-specificità di queste molecole, lo specifico microRNA da analizzare in un dato tessuto; non c'è, infatti, consenso né su quale sia la matrice biologica ideale da valutare, né sui miRNA *reference* e target da quantificare. Per questo motivo sono auspicabili ulteriori e più ampi studi standardizzati con campioni umani [Maiese et al, 2021].

1.4.1 Gli studi sui miRNA nei fluidi biologici umani per la stima del PMI

Si evince da alcune *reviews* come la maggioranza degli studi in merito all'utilizzo dei microRNA per la stima del PMI riguardino soprattutto modelli animali murini allo scopo di identificare i migliori miRNA, sia target che di riferimento, attraverso la valutazione di diverse variabili, quali i tessuti, i PMI precoci/lunghi, le diverse temperature di conservazione dei campioni *postmortem* e le cause di morte; queste variabili risultano avere un profondo impatto sull'espressione *postmortem* dei miRNA, tale da rendere altamente probabile che l'utilizzo di un singolo biomarcatore possa non essere sufficiente allo scopo [Montanari et al, 2021]. Da questo punto di vista, tra l'esiguo numero di studi sui campioni umani, ve ne sono due che hanno esaminato alcuni fluidi biologici (umor vitreo e sangue) e che si sono concentrati sull'identificazione di un'attività circadiana per alcuni miRNA specifici, le cui concentrazioni relative nell'umor vitreo e/o nel sangue potrebbero essere utilizzate come criterio di differenziazione tra morti diurne e notturne nella determinazione del PMI. Si tratta dello studio spagnolo sull'umor vitreo del 2013 di Odriozola et al e di quello italiano su sangue e umor vitreo del 2015 di Corradini et al. Essi hanno dimostrato la fattibilità dell'analisi e l'andamento circadiano dell'espressione di alcuni miRNA, giungendo però a conclusioni discordanti sia in merito ai miRNA target individuati che ai *reference markers* da utilizzare. Ambedue gli studi si sono avvalsi, per l'analisi, di saggi in qRT-PCR, dopo l'estrazione dell'RNA dai campioni e la retrotrascrizione in cDNA. Odriozola et al, in ragione della bassa cellularità dell'umor vitreo e della conseguente scarsa concentrazione di miRNA, ha sottoposto i campioni ad un'ulteriore preamplificazione prima di procedere in qRT-PCR. Oltre alle differenze nelle metodologie

applicate, questo risultato contraddittorio potrebbe essere correlato all'esiguo numero di campioni studiati in entrambi gli esperimenti: 7 campioni per una prima analisi esplorativa e 34 campioni per la successiva analisi approfondita del marker selezionato in Odriozola et al, tutti raccolti entro 24 ore dal decesso e quindi congelati; 24 campioni totali (di cui 12 di sangue, prelevati entro 48 ore dalla morte, e 12 di umor vitreo, raccolti entro 24 ore dal decesso) in Corradini et al. In entrambi gli studi non sono stati considerati, inoltre, i possibili fattori di influenza, come età, sesso, stato di salute, durata dell'agonia e intensità della luce nel periodo di raccolta. Nel primo caso sono stati valutati ben 754 miRNA, usando come *reference* il mir-222, mentre nel secondo sono stati studiati 10 miRNA con un presunto ruolo nei ritmi circadiani, avvalendosi di SNORD95 (un piccolo RNA nucleolare) come *reference*. Odriozola et al ha evidenziato, considerando intervalli temporali diversi, più o meno ristretti, una differenza significativa tra morti diurne (h.10:30-13:30 nella prima parte dello studio, h. 07:30-20:00 nella seconda parte) e notturne (h.02:00-04:30 nella prima parte, h. 22:00-06:00 nella seconda parte) nell'espressione di mir-142-5p e mir-541. Corradini et al ha riconosciuto, in campioni suddivisi tra diurni e notturni in base agli orari di alba e tramonto del sole, lo stesso andamento circadiano per mir-142-5p e mir-541 soltanto nel sangue, individuando, invece, mir-106b e mir-96 come possibili marcatori circadiani nell'umor vitreo. Risultando i microRNA generalmente stabili per almeno 24 ore, senza significativa degradazione, non è stata dimostrata alcuna correlazione significativa tra il livello di espressione dei miRNA e il PMI; quindi, la valutazione di questi marcatori potrebbe essere utile per stabilire se la morte è avvenuta durante il giorno o di notte, ma non effettivamente nella stima dell'intervallo dalla morte [Montanari et al, 2021]. Tutti gli autori, anche gli stessi Odriozola et al e Corradini et al, concordano sulla necessità di ulteriori studi nell'uomo, implementando il numero dei campioni e considerando i possibili fattori di influenza, nell'ottica di confermare il potenziale impiego dei miRNA in questo ambito di ricerca.

1.5 Scopo della tesi

Con questo elaborato di tesi si è voluta valutare la fattibilità di uno studio sui microRNA nel sangue e nell'umor vitreo per la stima del *post mortem interval* (PMI), verificando la potenziale correlazione dell'espressione di questi marcatori molecolari con il *time since death*, tramite l'impiego di kit commerciali per le varie fasi dell'analisi, compresa l'estrazione, e la quantificazione del livello di espressione dei miRNA in Real-time RT-PCR. Sono stati analizzati vari marcatori, scelti tra quelli individuati come miRNA target dagli studi precedenti sullo stesso argomento di Odriozola et al e di Corradini et al (mir-541-3p, mir-142-5p, mir-96-5p nell'umor vitreo e mir-142-5p, mir-16-5p, mir-219a-5p nel sangue), con l'obiettivo di verificarne la presenza negli stessi tipi di fluido biologico, a distanza anche di anni e dopo conservazione a – 20°C, ed individuare quelli con un modello oscillante di variazione, eventualmente correlabile ai ritmi circadiani e/o alla presenza/assenza di luce. Sono state acquisite, durante la raccolta dei dati, non soltanto le informazioni in merito all'orario di morte, diurno o notturno, e a quello di raccolta dei campioni, ma anche le notizie concernenti l'eventuale ricovero in Terapia Intensiva, il sesso e l'età dei soggetti, per valutarli come potenziali fattori di influenza.

Capitolo Secondo

TECNICHE DI ANALISI

In questa sezione vengono descritti i principi generali sottostanti le tecniche di analisi impiegate in questo studio; esse verranno illustrate nello specifico, in merito ai materiali e ai relativi protocolli utilizzati, nel capitolo seguente (*Capitolo Terzo, Materiali e metodi*).

2.1. Estrazione dell'RNA

Esistono diversi metodi di estrazione dell'RNA, tutti accomunati dall'obiettivo di ottenere campioni di acido ribonucleico privi di contaminanti, passando attraverso fasi ben definite:

1. Lisi cellulare.

La lisi delle membrane biologiche tramite metodi meccanici (pestello e mortaio, omogeneizzatore), chimici (impiego di detergenti blandi come SDS) o enzimatici (proteinasasi K) permette il rilascio del contenuto genomico.

2. Purificazione.

Gli acidi nucleici vengono separati dal restante contenuto cellulare e depurati sia dalle nucleasi, in grado di scindere i legami fosfodiesterici tra le basi azotate, che dalle sostanze interferenti con il processo di amplificazione che avverrà dopo l'estrazione. Generalmente si utilizzano a questo scopo degli enzimi proteolitici, come la pronasi o la proteinasasi K, che andranno successivamente eliminati.

3. Separazione degli acidi nucleici tra loro.

Per ottenere RNA puro decontaminato dal DNA genomico viene utilizzato l'enzima DNasi, anch'esso eliminato attraverso dei lavaggi al termine del processo.

4. Recupero tramite eluizione dell'RNA purificato.

Il metodo classico di estrazione e purificazione dell'RNA con solventi organici (fenolo acido e guanidina tiocianato) avviene, diversamente che per il DNA, in ambiente acido, utilizzando del fenolo tamponato con una soluzione a pH 5-6. In questo modo si ottiene, dopo centrifugazione, una miscela in tre fasi all'interno della quale i due diversi tipi di acido

nucleico si separano: l'RNA resta nella fase acquosa superiore, che verrà recuperata, mentre il DNA passa nella fase fenolica inferiore insieme ai lipidi e alle proteine ricche di amminoacidi idrofobici. A separarle si trova un'interfaccia contenente le proteine denaturate (Fig.3). L'acido ribonucleico viene quindi fatto precipitare in isopropanolo, lavato con etanolo al 70%, recuperato come pellet e risospeso in acqua *RNAsi-free* o in tampone a bassa forza ionica.

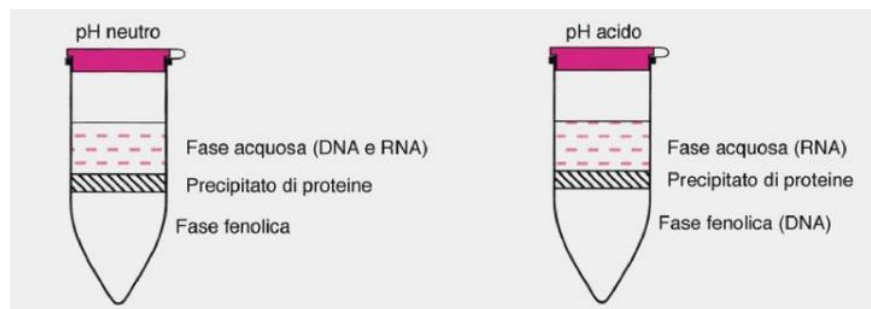


Fig.3: Estrazione fenolica degli acidi nucleici

Attualmente vengono più comunemente utilizzati dei kit commerciali di isolamento e purificazione diretta in fase solida, molti dei quali basati sull'affinità dell'acido nucleico per le matrici di silice. Questi metodi utilizzano un supporto solido di cattura dell'RNA, come biglie magnetiche o colonnine, che permettono di trattenere il campione durante i lavaggi, in fase di purificazione, consentendone infine il distacco e l'eluizione, ottenendo generalmente un preparato molto puro (Fig.4).



Fig.4: Estrazione degli acidi nucleici tramite isolamento e purificazione diretta in fase solida (*magnetic beads*)

Per questo studio è stato utilizzato il kit *MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems)*. Si tratta di un sistema ancora non in uso per la diagnostica, progettato per l'isolamento manuale dell'RNA totale, inclusi i piccoli RNA come i miRNA, da un'ampia varietà di matrici biologiche (tessuti, cellule, urine, sangue intero, siero e plasma). Esso sfrutta la tecnologia a sfere magnetiche *MagMAX™*, le quali legano l'acido ribonucleico e lo trattengono durante la purificazione, permettendo il recupero di RNA di alta qualità, adatto all'applicazione dei saggi *TaqMan® miRNA Assays* utilizzati successivamente. La procedura, descritta in *MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit USER GUIDE, Publication Number MAN0011131, Revision C.0, ThermoFisher Scientific*, prevede le tipiche fasi di lisi, purificazione da contaminanti e DNA ed eluizione. La lisi e la purificazione avvengono tramite l'utilizzo di diversi reagenti, tra cui la proteinasi k e il 2-mercaptoetanolo, che è un agente dissociante dei legami disolfuro responsabili del mantenimento della struttura, e quindi dell'attività, delle RNAsi. Il processo di lisi è ulteriormente favorito dalla temperatura elevata (65°C) a cui sono sottoposti inizialmente i campioni. Successivamente si ha il legame dell'RNA con la fase solida *RNA binding beads* (biglie magnetiche di silice), contenuta in uno dei reattivi. I campioni vengono quindi sottoposti ad una serie sequenziale di lavaggi e di incubazioni in agitazione a velocità (rpm)

e durata diverse; durante le operazioni di lavaggio i campioni vengono disposti in appositi rack magnetici che trattengono, fino alla successiva fase di asciugatura, le biglie con l'RNA legato. Il trattamento seguente con l'enzima DNAsi, dopo il distacco degli acidi nucleici dalle sfere, permette la degradazione del DNA genomico ancora presente nel campione. L'RNA viene poi nuovamente legato dalle *beads*, trattenuto dal magnete del rack, ancora ripetutamente lavato e asciugato, e infine eluito, dopo essersi distaccato dalle biglie grazie ad un apposito buffer di eluizione preriscaldato. Per monitorare l'efficacia dell'estrazione, a tutti i campioni è stato aggiunto in concentrazione finale di 1–10 pM il controllo esogeno (*SPIKE-IN*) ath-mir-159a, un oligonucleotide di RNA sintetico da *Arabidopsis thaliana*, caratterizzato da una sequenza target 5'-UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA-3' non presente nei campioni umani.

L'RNA è una molecola molto instabile a causa della presenza di un ossidrile libero in posizione 2' sul ribosio, è soggetta ad idrolisi in soluzione acquosa alcalina e risulta particolarmente suscettibile all'azione delle RNAsi, sia endogene, liberate durante la lisi cellulare, che esogene, le cui presenza risulta ubiquitaria. La loro attivazione in assenza di cofattori, la resistenza alle alte temperature e la capacità di ricostituire la loro struttura proteica secondaria anche dopo il trattamento con agenti denaturanti, se questi non vengono allontanati, fanno sì che le RNAsi rappresentino il maggior problema in sede di estrazione. Per inibire l'attività di questi enzimi, sia durante l'estrazione che in linea generale durante la manipolazione di campioni di RNA, è opportuno adottare alcune precauzioni: lavorare a basse temperature, preferibilmente in ghiaccio (le ribonucleasi cellulari hanno un *optimum* di funzionamento alla temperatura dell'organismo), impiegare inibitori delle RNAsi, come i sali di guanidio (guanidio cloruro, guanidio tiocianato) e il 2-mercaptoetanolo (o β -mercaptoetanolo), oltre ad attrezzature, reagenti e plastiche *RNasi-free*. I guanti devono essere cambiati frequentemente, mentre i piani di lavoro, le superfici e i pipettatori vanno decontaminati con soluzioni a base di ipoclorito di sodio.

2.2 Preparazione dei cDNA templates

Prima di poter quantificare i livelli di espressione dei microRNA di interesse con gli appositi saggi in qRT-PCR, vengono preparati dei templati di cDNA (*complementary DNA*) a singola elica, a partire dai miRNA maturi contenuti nell'RNA totale estratto. Il DNA complementare è, infatti, una molecola molto più stabile rispetto all'RNA e meno sensibile alla degradazione; per questo nei laboratori di biologia molecolare si impiega comunemente la retrotrascrizione, o trascrizione inversa, per ottenere, dagli RNA, delle molecole di DNA più facilmente utilizzabili per le tecniche di analisi, soprattutto nell'ambito degli studi sull'espressione genica.

Nel caso dello specifico kit impiegato per questo studio (*TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit, Applied Biosystems*), il campione è rappresentato dall'eluato di RNA totale, privo sia di inibitori della trascrizione inversa e della PCR che di attività delle RNasi. La vera e propria reazione di retrotrascrizione in cDNA, catalizzata dall'enzima trascrittasi inversa, viene preceduta dalla modificazione dei miRNA attraverso due fasi distinte: essi vengono prima sottoposti ad una poliadenilazione, con cui l'estremità 3' del trascritto maturo viene estesa attraverso l'aggiunta di una coda poli(A), poi ad un allungamento dell'estremità 5' mediante la ligazione di un adattatore, come riportato in *TaqMan® Advanced miRNA Assays USER GUIDE, Publication Number 100027897, Revision C. ThermoFisher Scientific*. La coda di poli(A) in 3' legherà il primer universale RT, utilizzato durante la successiva retrotrascrizione in cDNA dei miRNA modificati, operata dall'enzima trascrittasi inversa (RT). L'adattatore in 5' funzionerà, invece, da sito di legame per il primer *forward* durante l'ultimo step, cioè l'amplificazione *miR-Amp*, la quale permetterà di incrementare il numero di molecole presenti di cDNA (Fig.5). Ogni singola fase (poliadenilazione, ligazione dell'adattatore, retrotrascrizione e amplificazione *miR-Amp*) prevede la preparazione di una miscela di reazione con componenti specifici, tra cui i primer e i dNTPs per la retrotrascrizione e l'amplificazione, con un passaggio in termociclatore per tempi e a temperature predefiniti.



Fig.5: Il processo di sintesi di cDNA con *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems)*

2.3. Real-time RT-PCR (qRT-PCR)

La Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) è una tecnica che consente di procedere simultaneamente al processo di amplificazione dell'acido nucleico (cDNA) e alla rivelazione dell'amplificato stesso, permettendone la quantificazione. Si avvale di uno strumento che associa un termociclatore, all'interno del quale avvengono le variazioni cicliche di temperatura necessarie alle diverse fasi dell'amplificazione in PCR, ad un sistema ottico (fluorimetro) e ad un software specializzato per l'elaborazione dei dati. Viene, in tal modo, monitorata in tempo reale la quantità del prodotto di amplificazione generato, la cui rivelazione è resa possibile grazie all'impiego di molecole capaci di generare segnali fluorescenti quando esse vengono irradiate da una sorgente luminosa (Fig.6). La misura della fluorescenza emessa riflette la quantità di amplificato prodotto ad ogni ciclo.



Fig.6: Il sistema di rivelazione del segnale fluorescente

La vera e propria reazione di amplificazione vede il susseguirsi di un certo numero di cicli consecutivi di denaturazione, appaiamento ed estensione, caratterizzati da temperature diverse (Fig.7), in seguito ai quali si genereranno migliaia di copie identiche all'acido

nucleico precedentemente estratto dal campione in analisi. Durante l'ultima fase di estensione, infatti, la Taq polimerasi, a partire dai primer, dà avvio alla reazione di polimerizzazione dei nucleotidi liberi per sintetizzare un nuovo filamento complementare a quello usato come stampo; alla fine di ogni singolo ciclo, si otterranno, quindi, per ogni molecola di partenza, due molecole identiche. L'aumento della temperatura a 95°C innesca la reazione per una seconda volta, ripartendo dalla denaturazione.

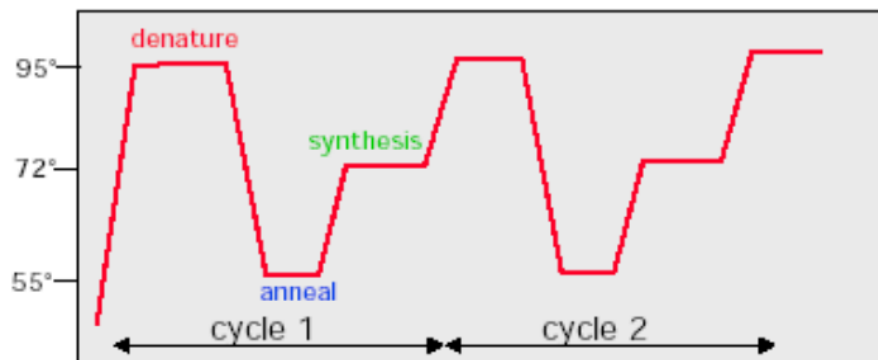


Fig.7: Il ciclo di qRT-PCR: denaturazione, appaiamento ed estensione

La resa effettiva di una *Polymerase Chain Reaction* non corrisponde, però, all'iniziale resa teorica al raddoppio delle molecole di acido nucleico presenti nel campione. Questo a causa del consumo dei reagenti, della perdita di efficienza della Taq polimerasi dopo un certo numero di cicli e del *reannealing* dei filamenti. La cinetica della reazione non procede, quindi, fino al termine (generalmente 30-40 cicli) con lo stesso andamento, ma secondo tre fasi: una prima fase esponenziale, una seconda lineare ed infine un *plateau*, caratterizzato dal mancato incremento dei prodotti (Fig.8).

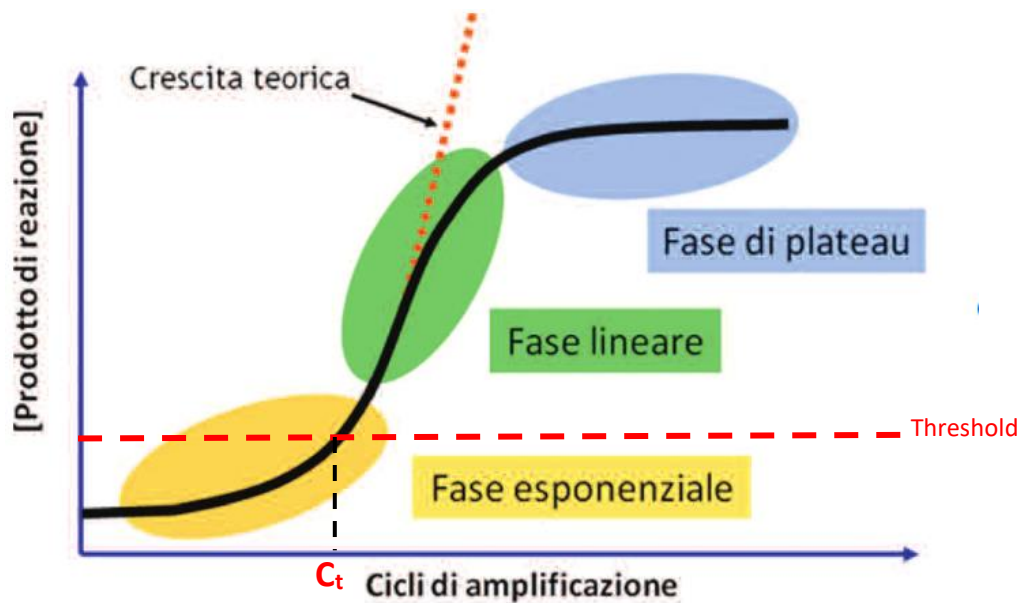


Fig.8: Cinetica della reazione di qRT-PCR

Andando a valutare in tempo reale la formazione degli ampliconi ad ogni ciclo in fase esponenziale, durante la quale l'efficienza della reazione è influenzata minimamente dalle variabili, per cui esiste ancora una proporzionalità tra la fluorescenza emessa e la concentrazione di acido nucleico nel campione, la PCR Real-time si pone come una tecnica quantitativa. Viene così, di fatto, superato uno dei limiti della PCR convenzionale, che rappresenta, invece, una tecnica *end-point* qualitativa o al massimo, assumendo particolari accorgimenti, semi-quantitativa. Essa rileva, infatti, la formazione degli amplificati soltanto alla fine della reazione, cioè in fase di *plateau*, quando viene meno la proporzionalità tra il segnale e la concentrazione. La qPCR risulta, quindi, più sensibile ed accurata, oltre che sicura per l'operatore e veloce, consentendo anche l'analisi simultanea di molti campioni e la loro comparazione. Alla classica mix di reazione utilizzata per l'amplificazione in PCR, composta da Taq polimerasi, due primer, dNTPs, ioni magnesio, buffer e acqua per portare a volume, vengono aggiunte, oltre al campione (*template*), delle molecole capaci di emettere un segnale fluorescente, la cui intensità risulta in rapporto molare con l'amplicone formato. Si tratta di sonde oligonucleotidiche di DNA (*probes*), specifiche per la sequenza in esame e marcate con fluorofori, oppure di leganti fluorescenti, come il

SYBR®GREEN, che vanno ad intercalarsi tra le basi dell'amplicone di dsDNA in modo non dipendente dalla sequenza, per cui viene rivelata la generica formazione di amplificati aspecifici, compresi i dimeri dei primers. Esistono diversi tipi di *probes* fluorescenti specifici (sonde *Taqman*, *FRET*, *Molecular Beacons*, *Scorpion*).

Per questo studio sono state utilizzate le sonde specifiche *TaqMan® MGB probes*, che fanno parte del kit commerciale *TaqMan® Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems)*. Si tratta di un set di primer e sonde progettato per quantificare il livello di espressione di alcuni microRNA nei campioni tramite l'amplificazione in Real-time RT-PCR dei templati di cDNA ottenuti nello step precedente di analisi. Come illustrato in *ThermoFisher Scientific, TaqMan® Advanced miRNA Assays USER GUIDE, Publication Number 100027897, Revision C*, si tratta di sonde a idrolisi composte da una sequenza oligonucleotidica complementare alla sequenza target, le quali presentano all'estremità 5' un fluoroforo *reporter* ad alta energia (R) e all'estremità 3' un inibitore del fluoroforo, o *quencher*, a bassa energia, non fluorescente (NFQ), oltre ad un legante *Minor Groove Binder* (MGB) sempre in 3'. La sonda si appaia ad una sequenza complementare che si trova tra i siti di legame per i primer. Quando essa è intatta, la vicinanza del *quencher* al *reporter* spegne la fluorescenza di quest'ultimo, assorbendone i fotoni. Durante la fase di allungamento la polimerasi (P) idrolizza la sonda, la quale si ibrida alla sequenza bersaglio, allontanando, in seguito all'incorporazione dei dNTPs complementari, il *reporter* dal *quencher*, con conseguente emissione del segnale fluorescente, una volta irradiato il campione (Fig.9). Si ha emissione di fluorescenza solo se la sonda risulta effettivamente complementare alla sequenza target e se questa viene amplificata durante la PCR. In ragione di queste condizioni, l'amplificazione non specifica non viene rilevata.

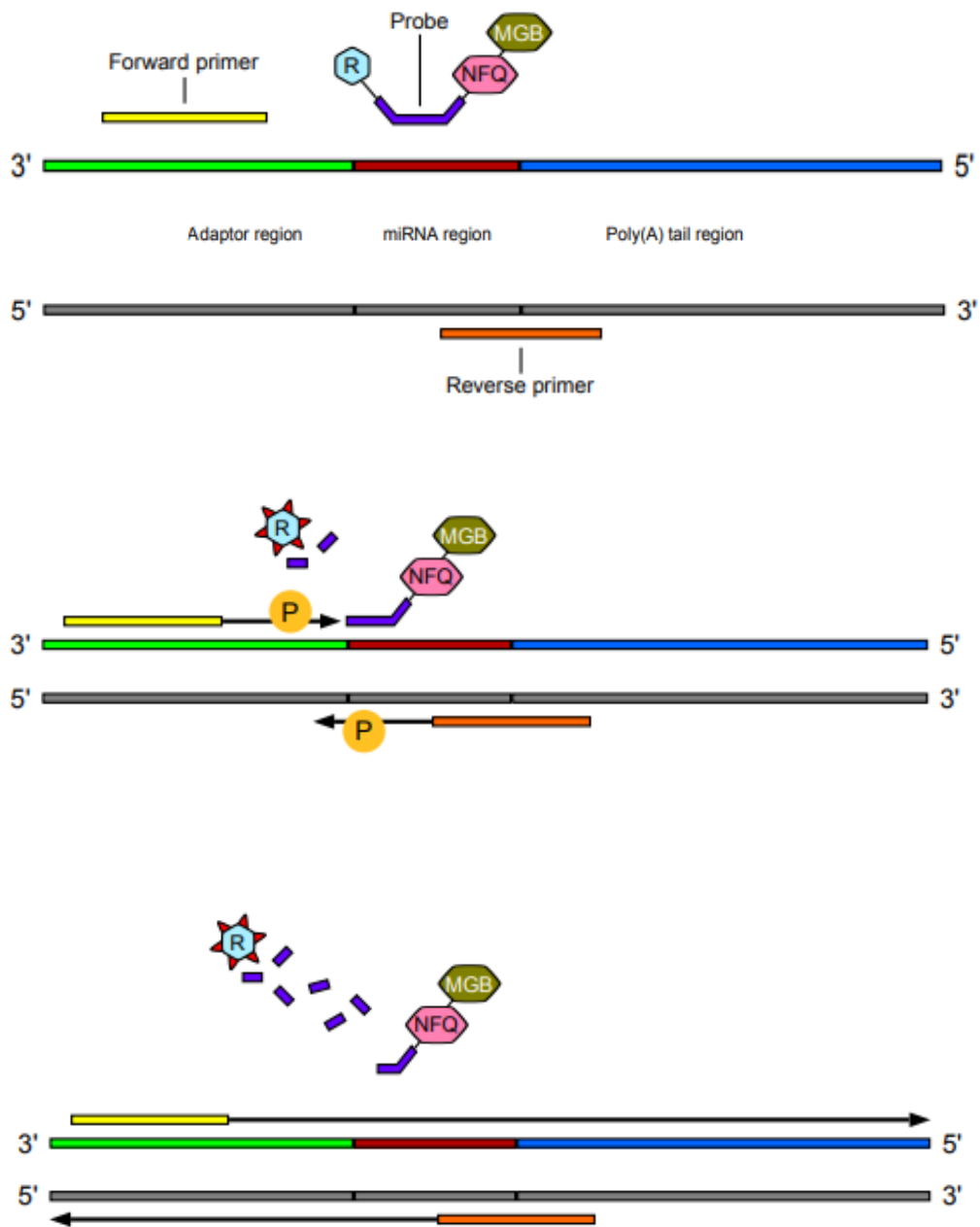


Fig.9: L'emissione di fluorescenza da parte della sonda *TaqMan*[®] MGB probe

Tramite l'impiego di questo kit sono stati ricercati e quantificati contemporaneamente microRNA diversi, in quanto i siti di legame dei primer specifici per ogni miRNA variano a seconda della sequenza del miRNA target.

Il segnale fluorescente emesso dalle sonde, ciclo dopo ciclo, viene visualizzato in output come una curva di amplificazione, la quale descrive l'aumento di fluorescenza in funzione

del numero dei cicli di PCR e della quantità di prodotto formato; tale segnale viene quantificato dallo strumento tramite un software, tenendo in considerazione alcuni parametri caratteristici:

- I. *Baseline*: rappresenta graficamente il livello del segnale durante i cicli iniziali della reazione, in cui si riscontra un cambiamento, non specifico, nell'emissione del segnale fluorescente, accostabile al rumore di fondo; viene determinata empiricamente per ogni singola reazione così da non includere nell'analisi il segnale aspecifico.
- II. *Threshold line*: rappresenta graficamente il livello in cui il segnale fluorescente specifico aumenta in modo statisticamente significativo sopra la linea di base, distinguendolo dal rumore di fondo; viene determinata direttamente dal software in base al valore di fluorescenza della *baseline*, ma può essere modificata dall'operatore per tutta la durata della fase esponenziale della reazione.
- III. *Threshold cycle* (C_t , ciclo soglia): rappresenta il numero di ciclo durante il quale il segnale fluorescente supera la *Threshold line*; il suo valore è inversamente proporzionale alla quantità di cDNA target iniziale.

Oltre a questi parametri analitici, per validare la seduta il software valuta ulteriori elementi (il coefficiente di correlazione R^2 , il limite di determinazione e la pendenza della curva di reazione) in merito alla sensibilità e alla specificità dell'analisi e all'efficienza della reazione per garantire che i risultati siano staticamente attendibili e riproducibili. La quantificazione dell'acido nucleico presente in partenza nel campione può essere determinata secondo due modalità diverse, in termini assoluti o relativi. Nel primo caso i valori vengono interpolati in una curva standard, costruita a partire da una serie di diluizioni dei campioni a concentrazione nota; nel secondo caso, invece, i valori di ogni singolo campione vengono confrontati dal software con un campione di riferimento, amplificato nella stessa reazione.

Capitolo Terzo

MATERIALI E METODI

3.1 Campioni

46 campioni autoptici, congelati a – 20°C, di cui 23 campioni di umor vitreo e 23 di sangue intero senza anticoagulante, provenienti da 23 soggetti diversi (Tabella I, *Capitolo Quarto, Risultati e Discussione*).

3.2 Protocollo di estrazione dell'RNA da umor vitreo con *MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems)*

Per l'estrazione dell'RNA dai campioni di umor vitreo è stato utilizzato, dietro indicazione della ditta produttrice, il protocollo specifico per il siero e il plasma.

Preriscaldare a 65°C un volume sufficiente di *Elution Buffer* (50 µl per campione).

Preparare la *TURBO DNase™ Solution* per il numero dei campioni come indicato nella tabella seguente:

Componente	Volume per campione
<i>MagMAX™ TURBO DNase™ Buffer</i>	48 µL
<i>TURBO DNase™</i>	2 µL
Volume totale <i>TURBO DNase™ Solution</i>	50 µl

Vortexare poi centrifugare brevemente la mix e conservarla in ghiaccio fino al momento dell'uso.

Preparare una provetta da 1.5 ml per ogni campione, contrassegnandola con il relativo codice.

Dispensare 5 µl di proteinasi K in ogni provetta.

Aggiungere 100,25 µl di campione di umor vitreo per ogni provetta.

Aggiungere 0,75 µl di controllo esogeno ath-mir-159a (conc. 1-10 pM) a ciascun campione.

Aggiungere 45 µL di *PK Digestion Buffer* in ogni provetta.

Incubare in agitazione a 950 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 5 minuti.

Incubare a 65°C per 30 minuti.

Preparare la *Lysis Binding Mix* come indicato nella tabella seguente:

Componente	Volume per campione
<i>Lysis Buffer</i>	99 µL
2-Mercaptoetanol	1 µL
Volume totale <i>Lysis Binding Mix</i>	100 µL

Vortexare poi centrifugare brevemente la mix.

Aggiungere 100 µL di *Lysis Binding Mix* ad ogni campione.

Aggiungere 20 µL di *RNA Binding Beads* ad ogni campione.

Incubare in agitazione a 700 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 7 minuti.

Aggiungere 270 µL di isopropanolo ad ogni campione.

Incubare in agitazione a 400 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 15 minuti.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 5 minuti o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Aspirare ed eliminare il surnatante.

Rimuovere le provette dal supporto magnetico.

Aggiungere 150 µl di *Wash Solution 1* per ogni campione.

Incubare in agitazione a 950 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 1 minuto.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 1 minuto o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Aspirare ed eliminare il surnatante.

Rimuovere le provette dal supporto magnetico.

Aggiungere 150 µl di *Wash Solution 2* per ogni campione.

Incubare in agitazione a 950 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 1 minuto.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 1 minuto o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Aspirare ed eliminare il surnatante.

Far asciugare il pellet ponendo le provette aperte in agitazione a 1150 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 5 minuti.

Aggiungere 50 µL di *TURBO DNase™ Solution* ad ogni campione.

Incubare in agitazione a 1050 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 15 minuti.

Aggiungere 50 µL di *Rebinding Buffer* ad ogni campione.

Aggiungere 100 µL di isopropanolo ad ogni campione.

Incubare in agitazione a 950 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 5 minuti.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 5 minuti o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Aspirare ed eliminare il surnatante.

Rimuovere le provette dal supporto magnetico.

Aggiungere 150 µl di *Wash Solution 2* per ogni campione.

Incubare in agitazione a 950 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 30 secondi.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 1 minuto o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Aspirare ed eliminare il surnatante.

Rimuovere le provette dal supporto magnetico.

Aggiungere 150 µl di *Wash Solution 2* per ogni campione.

Incubare in agitazione a 950 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 30 secondi.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 1 minuto o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Aspirare ed eliminare il surnatante.

Far asciugare il pellet ponendo le provette aperte a 21°C per 5 minuti in agitazione a 1150 rpm in *Eppendorf Thermomixer*.

Aggiungere 50 µL di *Elution Buffer* preriscaldato a 65°C ad ogni campione.

Incubare in agitazione a 1050 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 2 minuti.

Incubare a 65°C per 5 minuti.

Incubare in agitazione a 1050 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 2 minuti.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 3 minuti o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Trasferire il surnatante (eluato) in nuove provette da 1,5 ml.

Conservare a lungo termine a -20°C.

3.3 Protocollo di estrazione dell'RNA da sangue intero con *MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems)*

Preriscaldare a 65°C un volume sufficiente di *Elution Buffer* (50 µl per campione).

Preparare la *TURBO DNase™ Solution* per il numero dei campioni come indicato nella tabella seguente:

Componente	Volume per campione
<i>MagMAX™ TURBO DNase™ Buffer</i>	48 µL
<i>TURBO DNase™</i>	2 µL
Volume totale <i>TURBO DNase™ Solution</i>	50 µL

Vortexare poi centrifugare brevemente la mix e conservarla in ghiaccio fino al momento dell'uso.

Preparare una provetta da 1.5 ml per ogni campione, contrassegnandola con il relativo codice.

Dispensare 5 µl di proteinasi K in ogni provetta.

Aggiungere 50,25 µl di campione di sangue intero per provetta.

Aggiungere 0,75 µl di controllo esogeno ath-mir-159a (conc. 1-10 pM), precedentemente diluito 1:2, a ciascun campione.

Aggiungere 25 µL di *PK Digestion Buffer* a ciascun campione.

Incubare in agitazione a 950 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 5 minuti.

Incubare a 65°C per 10 minuti.

Preparare la *Binding Beads Mix* come indicato nella tabella seguente:

Componente	Volume per campione
<i>RNA Binding Beads</i>	10 μ L
<i>Lysis/Binding Enhancer</i>	10 μ L
Volume totale <i>Binding Beads Mix</i>	20 μ L

Vortexare poi centrifugare brevemente la mix e conservarla in ghiaccio fino al momento dell'uso.

Aggiungere 20 μ L di *Binding Beads Mix* ad ogni campione.

Incubare in agitazione a 850 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 5 minuti.

Preparare la *Lysis Binding Mix* come indicato nella tabella seguente:

Componente	Volume per campione
<i>Lysis Buffer</i>	65 μ L
2-Mercaptoetanololo	0.65 μ L
Volume totale <i>Lysis Binding Mix</i>	~ 65 μ L

Vortexare poi centrifugare brevemente la mix.

Aggiungere 65 μ L di *Lysis Binding Mix* ad ogni campione.

Incubare in agitazione a 800 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 5 minuti.

Aggiungere 135 μ L di isopropanolo ad ogni campione.

Incubare in agitazione a 700 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 10 minuti.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 5 minuti.

Aspirare ed eliminare il surnatante.

Rimuovere le provette dal supporto magnetico.

Aggiungere 150 μ L di *Wash Solution 1* per ogni campione.

Incubare in agitazione a 950 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 1 minuto.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 1 minuto o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Aspirare ed eliminare il surnatante.

Rimuovere le provette dal supporto magnetico.

Aggiungere 150 µl di *Wash Solution 2* per ogni campione.

Incubare in agitazione a 950 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 1 minuto.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 1 minuto o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Aspirare ed eliminare il surnatante.

Far asciugare il pellet ponendo le provette aperte in agitazione a 1150 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 2 minuti.

Aggiungere 50 µL di *TURBO DNase™ Solution* ad ogni campione.

Incubare in agitazione a 1050 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 15 minuti.

Aggiungere 50 µL di *Rebinding Buffer* ad ogni campione.

Aggiungere 100 µL di isopropanolo ad ogni campione.

Incubare in agitazione a 950 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 5 minuti.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 5 minuti o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Aspirare ed eliminare il surnatante.

Rimuovere le provette dal supporto magnetico.

Aggiungere 150 µl di *Wash Solution 2* per ogni campione.

Incubare in agitazione a 950 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 30 secondi.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 1 minuto o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Aspirare ed eliminare il surnatante.

Rimuovere le provette dal supporto magnetico.

Aggiungere 150 μ l di *Wash Solution 2* per ogni campione.

Incubare in agitazione a 950 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 30 secondi.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 1 minuto o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Aspirare ed eliminare il surnatante.

Far asciugare il pellet ponendo le provette aperte a 21°C per 5 minuti in agitazione a 1150 rpm in *Eppendorf Thermomixer*.

Aggiungere 50 μ L di *Elution Buffer* preriscaldato a 65°C ad ogni campione.

Incubare in agitazione a 1150 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 2 minuti.

Incubare a 65°C per 5 minuti.

Incubare in agitazione a 1150 rpm in *Eppendorf Thermomixer* a 21°C per 2 minuti.

Posizionare le provette sul rack magnetico per 3 minuti o fino a quando la soluzione diventa chiara.

Trasferire il surnatante (eluato) in nuove provette da 1,5 ml.

Conservare a lungo termine a -20°C.

3.4 Protocollo di preparazione dei cDNA *templates* con *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems)*

Scongellare gli estratti di RNA da umor vitreo e sangue intero e i reagenti in ghiaccio, vortexarli poi centrifugarli.

Preparare la *Poly(A) Reaction Mix* per il numero di campioni secondo la seguente tabella, calcolando un'eccedenza del 10%:

Componente	Volume per campione
<i>Poly(A) Buffer</i>	0.5 µL
ATP	0.5 µL
<i>Poly(A) Enzyme</i>	0.3 µL
Acqua <i>RNasi-free</i>	1.7 µL
Volume totale di <i>Poly(A) Reaction Mix</i>	3.0 µL

Vortexare poi centrifugare brevemente la mix.

Preparare una provetta da 0,2 ml per ogni campione, contrassegnandola con il relativo codice identificativo.

Dispensare 2 µl di campione in ogni provetta.

Aggiungere ad ogni campione 3 µl di *Poly(A) Reaction Mix*, per un volume totale di 5 µl per provetta.

Vortexare poi centrifugare brevemente.

Incubare in termociclatore come da tabella:

Step	Temperatura	Tempo
Poliadenilazione	37°C	45 minuti
<i>Stop reaction</i>	65°C	10 minuti
<i>Hold</i>	4°C	∞

Preparare la *Ligation Reaction Mix* secondo la tabella seguente, calcolando un'eccedenza del 10%:

Componente	Volume per campione
<i>5X DNA Ligase Buffer</i>	3 μ L
<i>50% PEG 8000</i> (a temperatura ambiente)	4.5 μ L
<i>25X Ligation Adaptor</i>	0.6 μ L
<i>RNA Ligase</i>	1.5 μ L
Acqua <i>RNasi-free</i>	0.4 μ L
Volume totale di <i>Ligation Reaction Mix</i>	10 μ L

Vortexare poi centrifugare brevemente la mix.

Trasferire 10 μ l della miscela di reazione in ciascuna provetta contenente il prodotto di reazione della poliadenilazione precedente (5 μ l), per un volume totale di 15 μ l per provetta.

Vortexare poi centrifugare brevemente.

Incubare in termociclatore come da tabella:

Step	Temperatura	Tempo
Ligazione	16°C	60 minuti
<i>Hold</i>	4°C	∞

Preparare la *RT Reaction Mix* secondo la tabella seguente, calcolando un'eccedenza del 10%:

Componente	Volume per campione
<i>5X RT Buffer</i>	6 μ L
<i>dNTP Mix (25 mM each)</i>	1.2 μ L
<i>20X Universal RT Primer</i>	1.5 μ L
<i>10X RT Enzyme Mix</i>	3 μ L
Acqua <i>RNasi-free</i>	3.3 μ L
Volume totale di <i>RT Reaction Mix</i>	15 μ L

Vortexare poi centrifugare la mix.

Trasferire 15 μ l della miscela di reazione in ciascuna provetta contenente il prodotto di reazione della ligazione precedente (15 μ l), per un volume totale di 30 μ l per provetta.

Vortexare poi centrifugare brevemente.

Incubare in termociclatore come da tabella:

Step	Temperatura	Tempo
Trascrizione inversa	42°C	15 minuti
<i>Stop reaction</i>	85°C	5 minuti
<i>Hold</i>	4°C	∞

Conservare il prodotto di reazione a -20°C per un massimo di 2 mesi.

Preparare la *miR-Amp Reaction Mix* secondo la tabella seguente, calcolando un'eccedenza del 10%:

Componente	Volume per campione
<i>2X miR-Amp Master Mix</i>	25 μ L
<i>20X miR-Amp Primer Mix</i>	2.5 μ L
Acqua <i>RNasi-free</i>	17.5 μ L
Volume totale di <i>miR-Amp Reaction Mix</i>	45 μ L

Vortexare poi centrifugare brevemente la mix.

Trasferire 45 μ l della miscela di reazione in una nuova provetta da 0,2 ml per ogni campione.

Aggiungere 5 μ l del prodotto di reazione della retrotrascrizione precedente, per un volume totale di 50 μ l per provetta.

Vortexare poi centrifugare brevemente.

Incubare in termociclatore come da tabella:

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
Attivazione enzima	95°C	5 minuti	1
Denaturazione	95°C	3 secondi	14
Appaiamento/Estensione	60°C	30 secondi	
<i>Stop reaction</i>	99°C	10 minuti	1
<i>Hold</i>	4°C	∞	1

Conservare il prodotto di reazione a -20°C per un massimo di 2 mesi.

3.5 Protocollo di Real-time RT-PCR con *TaqMan*[®] *Advanced miRNA Assays* (Applied Biosystems)

Scongellare i reagenti in ghiaccio, vortexarli poi centrifugarli brevemente.

Preparare una diluizione 1:10 dei campioni di cDNA, considerando che ogni campione va testato in doppio per ogni miRNA di interesse.

Preparare la *PCR Reaction Mix* per il numero dei campioni secondo la tabella seguente, calcolando un'eccedenza del 10%:

Componente	Volume per campione
<i>TaqMan</i> [®] <i>Fast Advanced Master Mix (2X)</i>	10 µL
<i>TaqMan</i> [®] <i>Advanced miRNA Assay (20X)*</i>	1 µL
Acqua <i>RNasi-free</i>	4 µL
Volume totale di <i>PCR Reaction Mix</i>	15 µL

**ath-miR-159a*, *hsa-miR-541-3p*, *hsa-miR-142-5p*, *hsa-miR-96-5p* per l'umor vitreo.

**ath-miR-159a*, *hsa-miR-142-5p*, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-219a-5p* per il sangue.

Vortexare poi centrifugare brevemente la mix.

Trasferire 15 µl della mix in una nuova provetta di reazione.

Aggiungere 5 µl di campione diluito 1:10 di cDNA, per un volume totale di 20 µl per provetta.

Vortexare poi centrifugare brevemente.

Introdurre le provette nello strumento per la Real-time PCR *Rotor-Gene*[™] *6000*, selezionare la modalità di ciclo veloce e procedere alla corsa come da tabella:

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
Attivazione enzima	95°C	20 secondi	1
Denaturazione	95°C	1 o 2 secondi	40
Appaiamento/Estensione	60°C	20 o 30 secondi	

3.6 Analisi dei dati

Per l'analisi dei dati è stato usato il software *Rotor-gene Q series software*, utilizzando la funzione "*Comparative Quantitation*" per confrontare nei campioni le espressioni relative dei microRNA di interesse rispetto al campione di controllo, in assenza di una curva standard per la corsa. Il software calcola i punti di *take off* dei campioni per ogni miRNA analizzato. La derivata seconda del grafico di amplificazione produce picchi corrispondenti alla velocità massima di aumento della fluorescenza nella reazione. Il punto di *take off* è definito come il ciclo in cui la derivata seconda è al 20% del livello massimo e indica la fine del rumore di fondo ed il passaggio alla fase esponenziale (Fig.10).

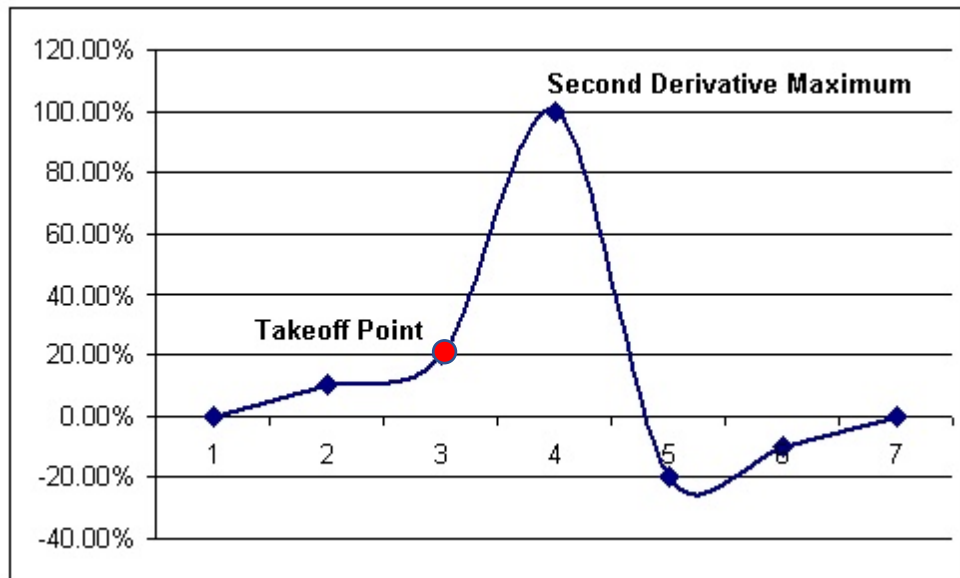


Fig.10: Derivata seconda della funzione esponenziale di amplificazione e punto di *take off*

Il software stima, inoltre, l'efficienza della reazione in ogni campione. Una reazione efficiente al 100% comporterebbe un raddoppio della quantità di un amplicone ad ogni ciclo. In termini di dati grezzi, il segnale dovrebbe crescere di una quantità doppia ad ogni ciclo nella fase esponenziale. Dunque, se il segnale era 50 unità di fluorescenza al ciclo 12, quindi è andato a 51 al ciclo 13, dovrebbe andare a 53 unità di fluorescenza al ciclo 14. Il software, infine, calcola il valore medio dei valori di *take off* e di efficienza della reazione

dei replicati. Come si evince dalla letteratura, non esiste un miRNA *reference* endogeno universale; non essendone stato identificato alcuno, tra quelli individuati nei campioni, che avesse caratteristiche idonee per essere utilizzato a questo scopo, i segnali dei miRNA target sono stati normalizzati contro il controllo esogeno di estrazione ath-mir-159a. I livelli di espressione per ciascun miRNA target sono stati, quindi, stimati come espressione genica relativa sulla base dei punti di *take off* e dell'efficienza di reazione. È stato successivamente applicato ai dati normalizzati il test *t di Student* a due code per valutare le differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) nei livelli di espressione dei microRNA tra morti diurne e notturne. Le morti sono state suddivise in diurne (10 campioni di soggetti morti tra le 09:00 e le 17:00) e notturne (13 campioni di soggetti morti tra le 19:00 e le 05:00), ipotizzando la presenza o meno di luce solare in base alla stagione, anche se non è stato possibile valutarne l'intensità né considerare l'eventuale luce artificiale in ambienti chiusi. Successivamente sono stati ristretti gli intervalli considerati, analizzando due gruppi di campioni, uno "strettamente notturno", formato da nove soggetti morti tra le 2:00 e le 4:30, ed un altro "strettamente diurno", comprendente cinque soggetti deceduti tra le 11:00 e le 12:35.

Capitolo Quarto

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 23 soggetti deceduti compresi in questo studio, da ognuno dei quali sono stati raccolti un campione di sangue ed uno di umor vitreo, 18 erano maschi e 5 femmine; l'età media al momento del decesso era di 60,1 anni per i maschi e 36,4 per le femmine. I campioni sono stati prelevati in sede di esame autoptico; il tempo intercorso tra il decesso ed il prelievo, durante il quale il corpo è stato comunque mantenuto in obitorio in stanza a temperatura controllata, variava tra le 32 ore e 50 minuti e le 129 ore e 46 minuti. Le cause della morte sono riconducibili essenzialmente a patologie cardiache, neoplastiche, traumatiche e intossicazione da sostanze. Tre soggetti sono stati ricoverati in terapia intensiva per un periodo variabile da qualche ora a dieci giorni. Nella Tabella I sono riassunte le caratteristiche dei campioni analizzati.

Utilizzando la procedura descritta, sono stati analizzati tre miRNA target in 23 campioni di umor vitreo (mir-541-3p, mir-142-5p e mir-96-5p) ed altrettanti miRNA in 23 campioni di sangue (mir-142-5p, mir-219a-5p e mir-16-5p), al fine di valutare una loro possibile correlazione con i ritmi circadiani, in base alle conclusioni raggiunte da due studi precedenti sul potenziale impiego dei microRNA per la stima del *post mortem interval* (Odriozola et al, 2013 e Corradini et al, 2015). La quantità dei microRNA analizzati è stata calcolata relativamente a quella del controllo esogeno ath-mir-159a, aggiunto durante la fase di estrazione ad ogni campione.

Campione	Sesso	Età alla morte	Data Morte	Ora Morte	Data Autopsia	Ora Autopsia	Ore tra morte e autopsia	CAUSA MORTE	Terapia Intensiva
167/18	F	36	27/10/2018 16:24	16:24	30/10/2018 17:00	17:00	72:36:00	Intossicazione da sostanze da abuso (metadone) con arresto cardio-respiratorio	10 gg
170/18	M	57	12/11/2018 05:00	05:00	14/11/2018 17:00	17:00	60:00:00	Plastic bag soffocation	
175/18	M	56	01/12/2018 11:00	11:00	04/12/2018 13:00	13:00	74:00:00	Asfissia meccanica da impiccamento	
177/18	M	75	01/12/2018 11:32	11:32	05/12/2018 15:30	15:30	99:58:00	Ematoma temporale dx con emorragia intraparietale	<24 ore
178/18	M	72	02/12/2018 03:00	03:00	05/12/2018 19:00	19:00	88:00:00	Mesotelioma e cachessia neoplastica	
190/18	F	39	14/12/2018 19:30	19:30	17/12/2018 14:00	14:00	66:30:00	Intossicazione da monossido di carbonio	
16/19	M	81	01/02/2019 12:35	12:35	06/02/2019 12:30	12:30	119:55:00	Insufficienza respiratoria acuta da mesotelioma	
17/19	M	35	08/02/2019 22:15	22:15	12/02/2019 15:00	15:00	88:45:00	Infarto acuto del miocardio	
18/19	M	50	21/01/2019 09:01	09:01	24/01/2019 16:15	16:15	79:14:00	Infarto acuto del miocardio	2 gg
48/19	M	74	29/03/2019 15:15	15:15	01/04/2019 16:30	16:30	73:15:00	Insufficienza respiratoria acuta da mesotelioma	
133/19	M	37	10/09/2019 11:30	11:30	13/09/2019 11:00	11:00	71:30:00	Incidente stradale con sfacelo cranico	
150/19	M	84	30/10/2019 04:14	04:14	04/11/2019 14:00	14:00	129:46:00	Insufficienza respiratoria acuta da mesotelioma	
152/19	M	41	02/11/2019 05:00	05:00	05/11/2019 15:00	15:00	82:00:00	Infarto acuto del miocardio	
160/19	F	30	23/11/2019 03:30	03:30	25/11/2019 14:00	14:00	58:30:00	Annegamento	
06/20	F	34	06/01/2020 04:30	04:30	09/01/2020 11:00	11:00	78:30:00	Politrauma da incidente con trauma vertebro-cervicale	
07/20	F	43	06/01/2020 04:27	04:27	09/01/2020 12:30	12:30	80:03:00	Politrauma da incidente con fracasso cranico	
37/20	M	55	03/03/2020 03:00	03:00	06/03/2020 14:00	14:00	83:00:00	Overdose cocaina + altre sostanze	
46/20	M	66	07/04/2020 02:10	02:10	11/04/2020 12:00	12:00	105:50:00	Insufficienza respiratoria acuta	
58/20	M	59	27/05/2020 11:12	11:12	29/05/2020 11:30	11:30	48:18:00	Shock terminale da ingestione di caustici	
59/20	M	33	30/05/2020 17:00	17:00	03/06/2020 09:30	09:30	88:30:00	Dilatazione ventricolo dx con disaccoppiamento elettromeccanico	
86/20	M	53	04/07/2020 09:20	09:20	09/07/2020 09:00	09:00	119:40:00	Incidente stradale con shock emorragico	
88/20	M	81	14/07/2020 03:43	03:43	16/07/2020 11:30	11:30	55:47:00	Arresto cardiocircolatorio in emorragia cerebrale	
112/20	M	73	03/09/2020 04:10	04:10	04/09/2020 13:00	13:00	32:50:00	Disturbo acuto del ritmo e della conduzione in cardiopatico cronico	

Tabella I: Caratteristiche dei campioni analizzati

L'analisi del controllo esogeno ath-mir159a ha subito evidenziato una criticità della metodica utilizzata. Esso, sebbene sempre presente, non mostra, però, lo stesso livello di espressione in tutti i campioni, nonostante sia stato aggiunto ad ognuno nella stessa quantità in fase di estrazione (Fig.11). Questo risultato potrebbe dipendere dalla procedura stessa di estrazione, effettivamente molto lunga e composta di molteplici passaggi, durante i quali possono verificarsi criticità varie, che potrebbero influire sulla resa del processo.

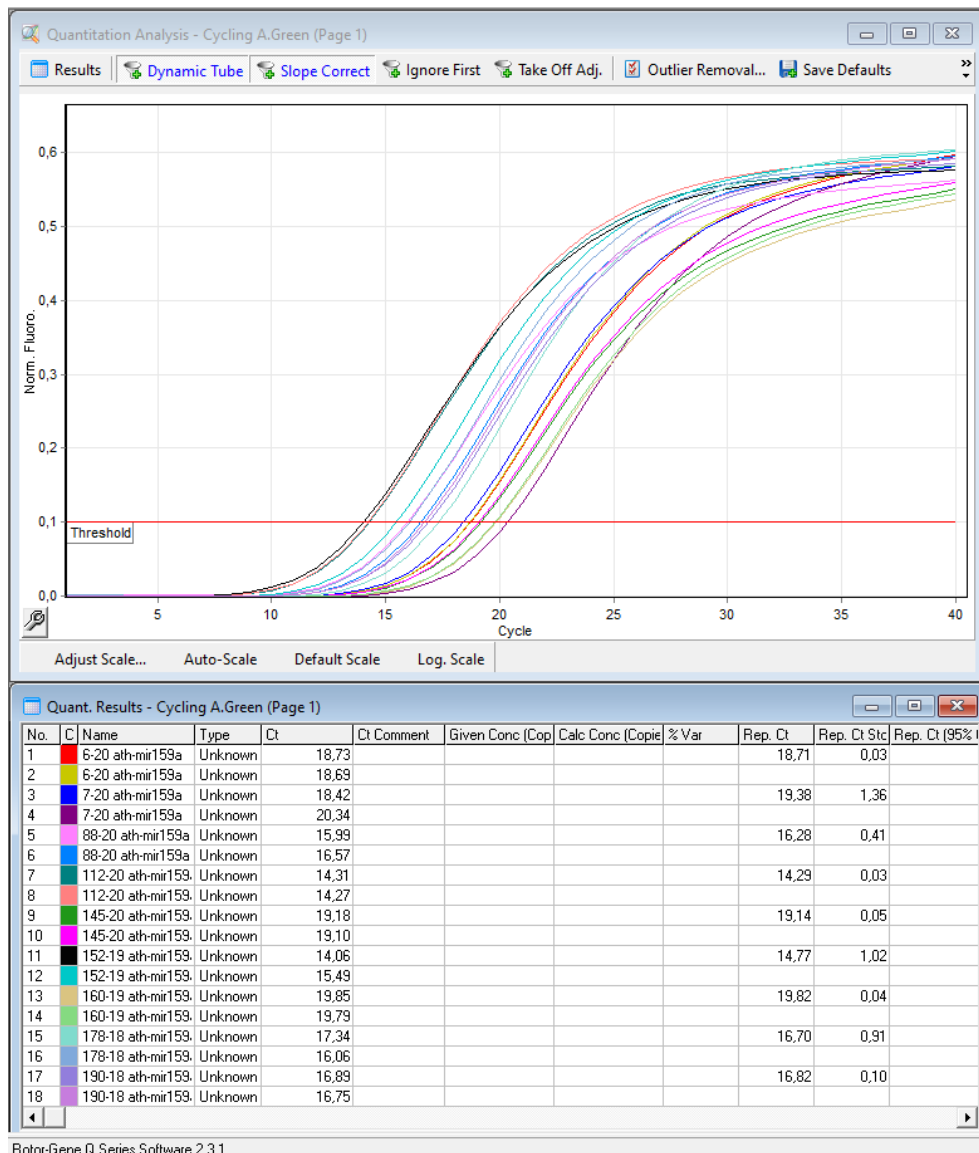


Fig.11: Analisi Real-time PCR del controllo esogeno ath-mir159a, effettuata in duplicato per ogni campione

Nonostante tale criticità, è stata, comunque, effettuata l'analisi per determinare l'espressione relativa dei microRNA di interesse attraverso una quantizzazione comparativa, considerando, campione per campione, l'espressione del riferimento ath-mir-159a e quella di ogni singolo miRNA target. Nella Tabella II sono riportati i valori di espressione relativa dei miRNA studiati nei campioni analizzati.

Campione	UMOR VITREO			SANGUE		
	mir-541-3p	mir-142-5p	mir-96-5p	mir-142-5p	mir-219a-5p	mir-16-5p
167/18	nd	nd	nd	nd	nd	1,02E-01
170/18	nd	nd	1,95E-01	2,53E-01	nd	2,44E+00
175/18	nd	nd	2,85E-01	4,89E-01	nd	4,48E+00
177/18	nd	nd	3,97E-01	1,12E-01	nd	1,35E+00
178/18	nd	nd	nd	3,89E-01	2,01E-02	4,08E+00
190/18	nd	nd	1,63E-01	1,64E+00	nd	1,57E+01
16/19	nd	nd	nd	3,39E-01	nd	9,25E-01
17/19	nd	nd	nd	nd	nd	1,64E-01
18/19	nd	nd	nd	5,60E-02	nd	7,92E-01
48/19	nd	nd	nd	nd	nd	1,82E+00
133/19	nd	nd	3,34E-01	8,80E-02	nd	4,27E-01
150/19	nd	nd	4,36E-01	7,73E-02	nd	1,38E+00
152/19	nd	nd	nd	nd	nd	1,33E+00
160/19	nd	nd	2,07E-01	nd	nd	9,99E+00
06/20	nd	nd	2,14E-01	1,16E+00	nd	8,54E+00
07/20	nd	nd	nd	4,61E-01	nd	4,86E+00
37/20	nd	nd	3,42E-01	5,83E-01	1,39E-01	4,15E+00
46/20	nd	nd	2,67E-01	3,22E-01	nd	7,65E-01
58/20	nd	nd	3,21E-01	1,15E-01	nd	2,16E+00
59/20	nd	nd	4,44E-01	4,34E-02	nd	1,58E+00
86/20	nd	nd	5,55E-01	nd	nd	3,28E-01
88/20	nd	nd	nd	nd	5,02E-03	1,51E+00
112/20	nd	nd	2,70E-01	1,73E-01	nd	2,05E+00

Tabella II: Espressione relativa dei miRNA analizzati (nd = non rilevabile)

È stato riscontrato un livello di espressione dei miRNA target generalmente molto basso, inferiore a quello del controllo esogeno (ath-mir-159a) e in diversi casi non determinabile, fatta eccezione per il mir-16-5p, presente in tutti i campioni di sangue, con livelli anche molto diversi tra loro. Nel sangue sono stati rilevati tutti i miRNA testati, anche se il mir-219a-5p soltanto raramente e il mir-142-5p non in tutti i campioni. Sono risultati, invece, non determinabili nell'umor vitreo due dei tre miRNA indagati, mir-541-3p e mir-142-5p, a differenza di quanto verificato da Odriozola et al, che, non solo ne indica la presenza nello stesso tipo di matrice biologica, ma attribuisce loro anche una differenza significativa nell'espressione tra morti diurne e notturne (Fig.12).

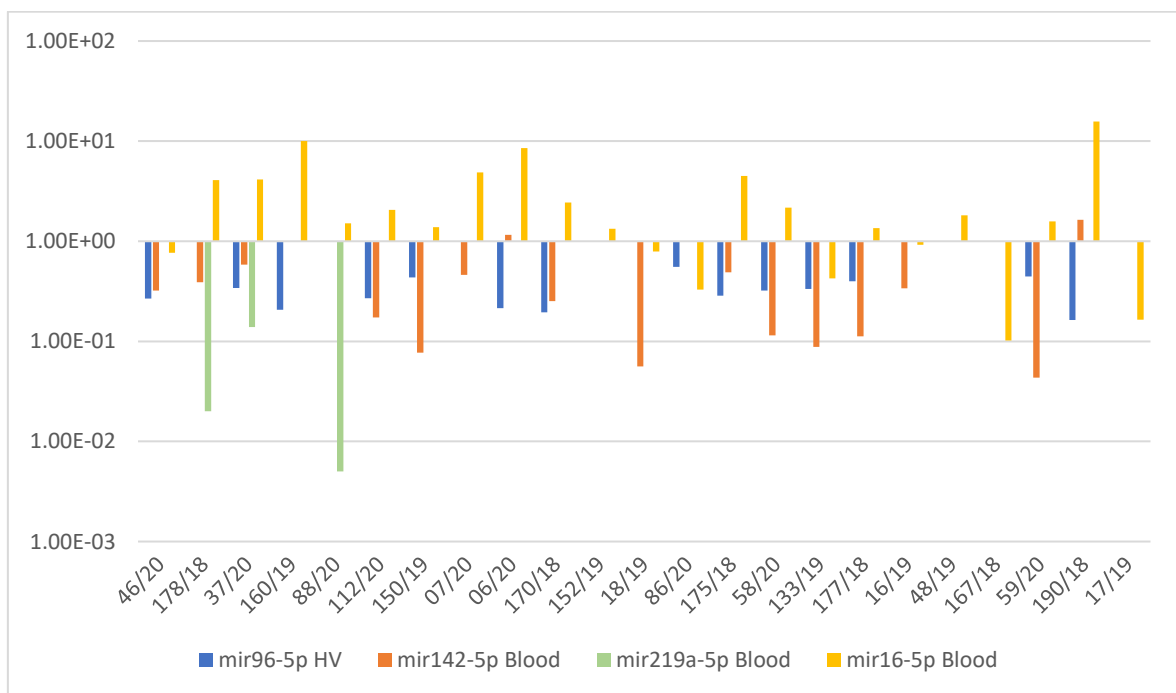


Fig.12: Espressione relativa dei miRNA analizzati in rapporto al miRNA *reference* ath-mir-159a (1.00E+00). In ordinata viene riportata l'espressione relativa in scala logaritmica. I campioni sono stati ordinati secondo l'orario della morte.

Nei grafici seguenti (Figg.13, 14, 15) vengono mostrate le espressioni relative dei vari miRNA analizzati nei campioni di individui morti di notte (19:00-05:00) o di giorno (09:00-17:00).

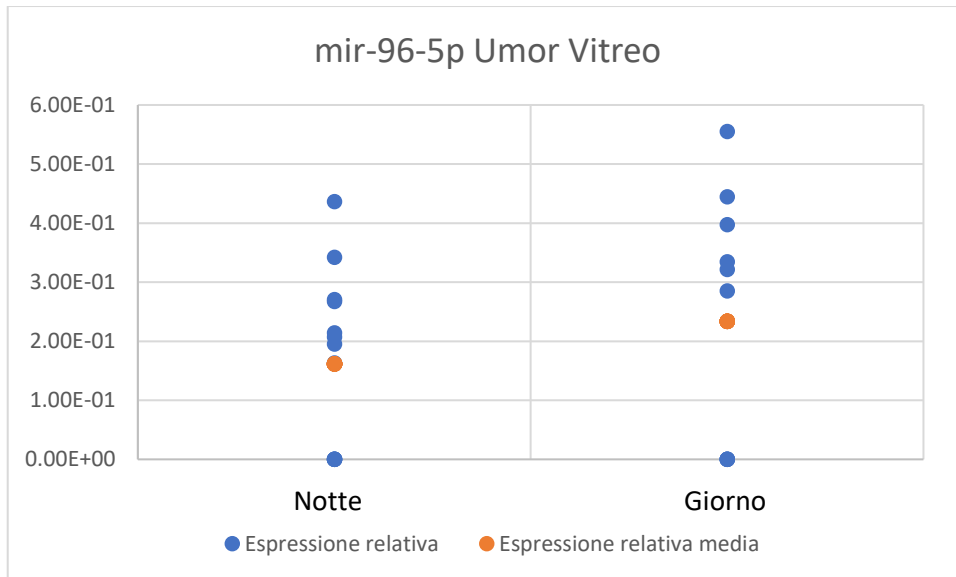


Fig.13

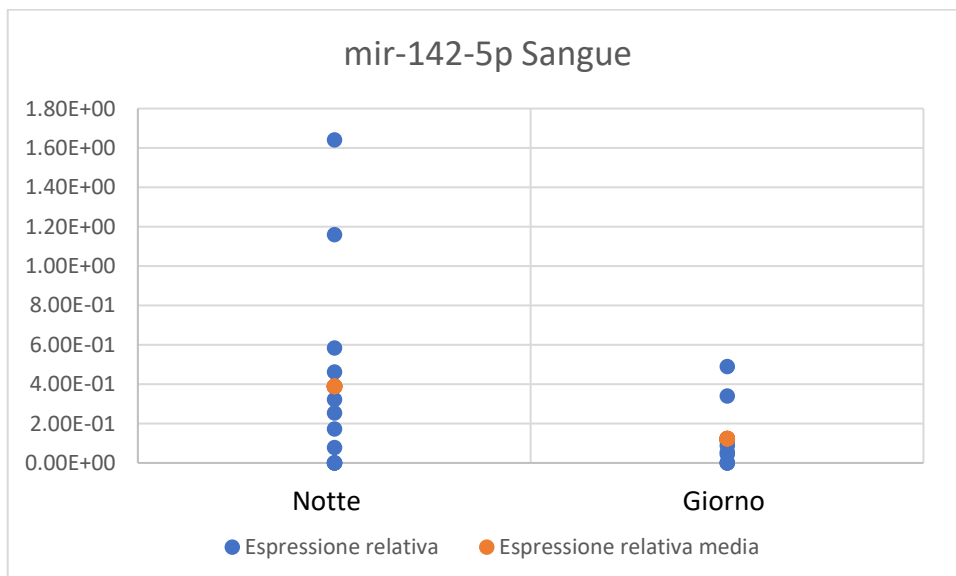


Fig.14

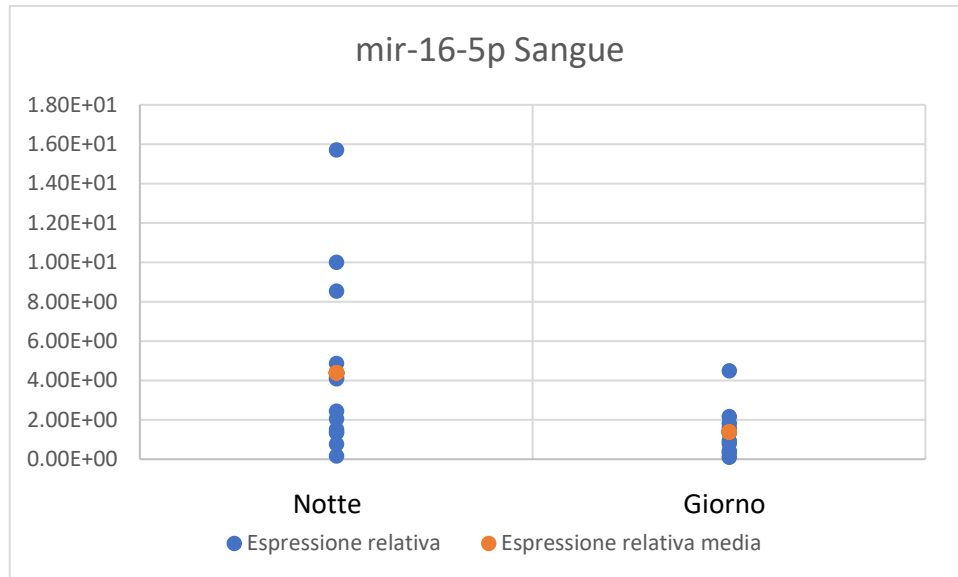


Fig.15

Valutando i risultati ottenuti con il test *t di Student* a due code, si riscontra che il livello di espressione di mir-16-5p nel sangue esprime una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi, tra loro indipendenti, di morti diurne (10 campioni di soggetti deceduti tra le 09:00 e le 17:00) e notturne (13 campioni di soggetti deceduti tra le 19:00 e le 05:00). Dal test risulta, infatti, che $p = 0.039376445$, quindi $p < 0.05$, e che il valore t ($t = 2,272096768$) è maggiore del t critico (t critico due code = $2,144786688$), quindi l'ipotesi nulla, per cui la differenza tra le medie dei due gruppi sia casuale, può essere rifiutata con un grado di certezza del 95% (Tabella III). Nessuno studio ha mai associato il mir16-5p con l'epoca della morte. La differenza osservata in questo lavoro potrebbe essere dovuta al diverso grado di emolisi a cui sono andati incontro i globuli rossi nel sangue dei soggetti deceduti. È noto, infatti, che un certo livello di emolisi si verifica sempre dopo la morte e che i livelli di mir16-5p variano in base ad essa, dato che questo microRNA è uno dei più abbondanti nei globuli rossi (Bruchova et al., 2007; Vasilatou et al., 2010). Il mir-96-5p, uno tra quelli indicati da Corradini et al come marcatori circadiani nell'umor vitreo, risulta espresso nella maggior parte dei campioni, ma senza presentare significatività statistica ($p = 0,37534674$) tra decessi diurni e notturni (Tabella IV).

	mir-16-5p notte	mir-16-5p giorno
Media	4,381461538	1,3964
Varianza	20,3223461	1,627908489
Osservazioni	13	10
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	14	
Stat t	2,272096768	
P(T<=t) una coda	0,019688222	
t critico una coda	1,761310136	
P(T<=t) due code	0,039376445	
t critico due code	2,144786688	

Tabella III: risultati del test *t di Student* assumendo varianze diverse per mir-16-5p nel sangue

	mir-96-5p notte	mir-96-5p giorno
Media	0,161076923	0,2336
Varianza	0,022266077	0,045878044
Osservazioni	13	10
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	15	
Stat t	-0,913662858	
P(T<=t) una coda	0,18767337	
t critico una coda	1,753050356	
P(T<=t) due code	0,37534674	
t critico due code	2,131449546	

Tabella IV: Risultati del test *t di Student* assumendo varianze diverse per mir-96-5p nell'umor vitreo

	mir-142-5p notte	mir-142-5p giorno
Media	0,3891	0,12424
Varianza	0,24786198	0,026468754
Osservazioni	13	10
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	15	
Stat t	1,797440997	
P(T<=t) una coda	0,046211513	
t critico una coda	1,753050356	
P(T<=t) due code	0,092423026	
t critico due code	2,131449546	

Tabella V: Risultati del test *t di Student* assumendo varianze diverse per mir-142-5p nel sangue

	mir-219a-5p notte	mir-219a-5p giorno
Media	0,012624615	0
Varianza	0,001473188	0
Osservazioni	13	10
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	12	
Stat t	1,185934532	
P(T<=t) una coda	0,129299824	
t critico una coda	1,782287556	
P(T<=t) due code	0,258599649	
t critico due code	2,17881283	

Tabella VI: Risultati del test *t di Student* assumendo varianze diverse per mir-219a-5p nel sangue

Successivamente, il test *t di Student* è stato applicato ad un sottoinsieme del gruppo originario, restringendo gli intervalli di tempo considerati, in modo da ottenere un campione “strettamente notturno”, formato da nove soggetti morti tra le 2:00 e le 4:30, ed un altro “strettamente diurno” comprendente cinque soggetti deceduti tra le 11:00 e le 12:35. In questo caso nessuno dei miRNA target, nemmeno il mir-16-5p, ha mostrato una differenza significativa tra i due gruppi “strettamente notturno” e “strettamente diurno” (Tabella VII). Il risultato non significativo per mir16-5p è in accordo con l’ipotesi che la significatività precedentemente osservata possa essere dovuta ad una differenza nell’emolisi di qualche campione nel gruppo originario.

	mir-16-5p notte	mir-16-5p giorno
Media	4,147222222	1,8684
Varianza	10,54966944	2,5354653
Osservazioni	9	5
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	12	
Stat t	1,758527139	
P(T<=t) una coda	0,052054283	
t critico una coda	1,782287556	
P(T<=t) due code	0,104108566	
t critico due code	2,17881283	

Tabella VII: Risultati del test *t di Student* assumendo varianze diverse nel sottogruppo per mir-16-5p nel sangue

	mir-96-5p notte	mir-96-5p giorno
Media	0,192888889	0,2674
Varianza	0,025629861	0,0239793
Osservazioni	9	5
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	9	
Stat t	-0,852258672	
P(T<=t) una coda	0,208086352	
t critico una coda	1,833112933	
P(T<=t) due code	0,416172705	
t critico due code	2,262157163	

Tabella VIII: Risultati del test *t di Student* assumendo varianze diverse nel sottogruppo per mir-96-5p nell'umor vitreo

	mir-142-5p notte	mir-142-5p giorno
Media	0,3517	0,2286
Varianza	0,13446041	0,0315663
Osservazioni	9	5
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	12	
Stat t	0,844393361	
P(T<=t) una coda	0,20748344	
t critico una coda	1,782287556	
P(T<=t) due code	0,41496688	
t critico due code	2,17881283	

Tabella IX: Risultati del test *t di Student* assumendo varianze diverse nel sottogruppo per mir-142-5p nel sangue

	mir219a-5p notte	mir219a-5p giorno
Media	0,018235556	0
Varianza	0,002094674	0
Osservazioni	9	5
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	8	
Stat t	1,195314107	
P(T<=t) una coda	0,133096253	
t critico una coda	1,859548038	
P(T<=t) due code	0,266192506	
t critico due code	2,306004135	

Tabella X: Risultati del test *t di Student* assumendo varianze diverse nel sottogruppo per mir-219a-5p nel sangue

I campioni sono stati raccolti in sede di autopsia giudiziaria o riscontro diagnostico, a una distanza di tempo superiore rispetto a quella che caratterizza gli studi di Odriozola et al (≤ 24 ore) e di Corradini et al (≤ 48 ore per il sangue e ≤ 24 h per l'umor vitreo). Non è possibile valutare se il mancato riscontro di determinati miRNA in alcuni campioni e/o i bassi livelli generali di espressione siano dovuti all'effettiva degradazione delle molecole in seguito al tempo maggiore intercorso tra il decesso ed il prelievo oppure alla lunga conservazione *post mortem* dei campioni stessi.

Sebbene questo lavoro non abbia permesso di replicare i risultati di Corradini et al e Odriozola et al, per altro tra loro discordanti, dimostra comunque che è possibile estrarre microRNA da campioni *post mortem*, prelevati anche a distanza di più di 24-48 ore, e conservati per periodi anche lunghi prima dell'analisi. Sicuramente la metodica di estrazione impiegata, composta da innumerevoli passaggi, ha rappresentato la maggiore criticità per valutare se il livello di espressione dei miRNA indagati potesse effettivamente correlarsi con l'epoca della morte e/o mostrare un andamento circadiano. Se la scelta del kit di estrazione è stata inizialmente vincolata dall'utilizzo degli specifici saggi *Taqman*, messi a punto dalla stessa ditta (*Applied Biosystems*), e dal tipo di matrici biologiche da analizzare, in quanto permette di estrarre l'RNA anche da sangue intero, sarebbe sicuramente preferibile una metodica estrattiva più snella e meno indaginosa. Inoltre, l'esiguo numero dei campioni analizzati e la loro eterogeneità per quanto concerne età,

causa di morte, fattori agonici e abitudini di vita rappresenta, ovviamente e come per ogni studio, un fattore limitante.

La ricerca nel campo del *miRNA profiling* in contesti *post mortem* è ancora in fase embrionale, tuttavia, la possibilità di analizzare i microRNA in campioni biologici dopo la morte li rende dei marcatori particolarmente attrattivi in ambito forense. Tra gli sviluppi futuri si prevede l'ampliamento della dimensione del campione e del numero di miRNA analizzati, accanto all'esame di possibili fattori di influenza, non ancora inclusi negli studi, quali l'età, il sesso, lo stato di salute, l'utilizzo abituale di farmaci e/o di sostanze ed il tempo trascorso tra la morte e il prelievo dei campioni biologici.

BIBLIOGRAFIA

- Bachmann J, Simmons T. The influence of preburial insect access on the decomposition rate. *J Forensic Sci.* 2010 Jul;55(4):893-900. doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01403.x. Epub 2010 Apr 20. PMID: 20412364
- Bauer M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet.* 2007 Mar;1(1):69-74. doi: 10.1016/j.fsigen.2006.11.002. Epub 2007 Jan 8. PMID: 19083730
- Bruchova H, Yoon D, Agarwal AM, Mendell J, Prchal J. T. (2007). Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Exp. Hematol.* 35, 1657–1667. doi:10.1016/j.exphem.2007.08.021
- Cattaneo C, Grandi M. *Antropologia e odontologia forense: guida allo studio dei resti umani: testo atlante.* Bologna, Monduzzi, 2004. - ISBN 88-323-4104-2
- Corradini B, Alù M, Radheshi E, Gabbolini V, Ferrari F, Santunione AL, Silingardi E. Estimation of the time of death through the analysis of clock miRNAs expression in blood and vitreous humor. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser 5* 2015; e204-e206
- Farrell, RE Jr. *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*, 5th edn, Elsevier, Academic Press, San Diego, 2017, ISBN 9780128046784
- Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Analytical biochemistry* vol. 387,2 (2009): 303-14. doi:10.1016/j.ab.2009.01.037
- Hayman J, Oxenham, M. *Human Body Decomposition*, London: Academic Press, Elsevier, 2016, ISBN 9780128036914

- Lv YH, Ma JL, Pan H, Zeng Y, Tao L, Zhang H, Li WC, Ma KJ, Chen L. Estimation of the human postmortem interval using an established rat mathematical model and multi-RNA markers. *Forensic Sci Med Pathol*. 2017 Mar;13(1):20-27. doi: 10.1007/s12024-016-9827-4. Epub 2016 Dec 28. PMID: 28032211

- Madea B. Methods for determining time of death. *Forensic Sci Med Pathol*. 2016 Dec;12(4):451-485. doi: 10.1007/s12024-016-9776-y. Epub 2016 Jun 4. PMID: 27259559

- MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit USER GUIDE, Publication Number MAN0011131, Revision C.0, ThermoFisher Scientific

- Maiese A, Scatena A, Costantino A, Di Paolo M, La Russa R, Turillazzi E, Frati P, Fineschi V. MicroRNAs as Useful Tools to Estimate Time Since Death. A Systematic Review of Current Literature. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Jan 3;11(1):64. doi: 10.3390/diagnostics11010064. PMID: 33401603; PMCID: PMC7823686

- Mehta N, Cheng HY. Micro-managing the circadian clock: The role of microRNAs in biological timekeeping. *J Mol Biol*. 2013 Oct 9;425(19):3609-24. doi: 10.1016/j.jmb.2012.10.022. Epub 2012 Nov 6. PMID: 23142644

- 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 Feb;25(4):1774-1787. doi: 10.26355/eurrev_202102_25069. PMID: 33660786

- Odriozola A, Riancho JA, de la Vega R, Agudo G, García-Blanco A, de Cos E, Fernández F, Sañudo C, Zarrabeitia MT. miRNA analysis in vitreous humor to determine the time of death: a proof-of-concept pilot study. *Int J Legal Med*. 2013 May;127(3):573-8. doi: 10.1007/s00414-012-0811-6. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23254460

- Scrivano S, Sanavio M, Tozzo P, Caenazzo L. Analysis of RNA in the estimation of post-mortem interval: a review of current evidence. *Int J Legal Med.* 2019 Nov;133(6):1629-1640. doi: 10.1007/s00414-019-02125-x. Epub 2019 Jul 18. PMID: 31317317

- Shrestha R, Kanchan T, Krishan K. Methods Of Estimation Of Time Since Death. 2021 Jul 20. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. . PMID: 31751057

- TaqMan® Advanced miRNA Assays USER GUIDE, Publication Number 100027897, Revision C. ThermoFisher Scientific.

- Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J (2010). The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur. J. Haematol.* 84, 1–1610.1111/j.1600-0609.2009.01348.x

- Vass AA. The elusive universal post-mortem interval formula. *Forensic Sci Int.* 2011 Jan 30;204(1-3):34-40. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.04.052. PMID: 20554133

- Vennemann M, Koppelkamm A. mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. *Forensic Sci Int.* 2010 Dec 15;203(1-3):71-5. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.07.006. Epub 2010 Aug 17. PMID: 20724085

- Zilg B, Bernard S, Alkass K, Berg S, Druid H. A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature. *Forensic Sci Int.* 2015 Sep;254:158-66. doi: 10.1016/j.forsciint.2015.07.020. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26232848

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio, innanzitutto, la mia relatrice, Dottoressa Chiara Turchi, ed il Direttore della S.O.D. di Medicina Legale degli Ospedali Riuniti di Ancona, Professor Adriano Tagliabracci, per avermi concesso l'opportunità di realizzare il sogno di una Tesi in Genetica Forense. Ringrazio la Dottoressa Turchi anche per la sua disponibilità, la gentilezza e la comprensione mostratemi fin dal primo giorno.

Ringrazio la Dottoressa Eva Montanari per avermi resa parte integrante ed attiva del suo progetto sui *clock miRNAs* e per la consulenza medico-legale durante la stesura di questo elaborato.

Il ringraziamento più grande va alla Dottoressa Federica Alessandrini, la mia correlatrice, per avermi indirizzata ed accompagnata, sempre efficientissima e disponibile, durante questo viaggio. Mi reputo estremamente onorata per aver avuto l'occasione di lavorare con una professionista così preparata e per aver potuto condividere tanto con una persona così eccezionale.

Ringrazio tutto il personale di laboratorio per avermi fatta sentire a casa, in modo particolare il signor Roberto Mencarelli e le Dottoresse Eleonora Ciarimboli, Lucia Fiordelmondo e Filomena Melchionda, e anche chi, fuori dal laboratorio, mi ha sempre incoraggiata e sostenuta sin dal primo momento, a partire da mio marito, mio padre e le mie amiche.

Un ringraziamento particolare al Dottor Tobia Barchi per la consulenza chimica esterna.