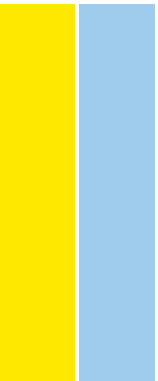


MESTRADO
MEDICINA LEGAL

MicroRNAs Associados às Vias de
Biossíntese do Cortisol e da
Aldosterona: Potenciais
Biomarcadores com Implicações
Médico-Legais.

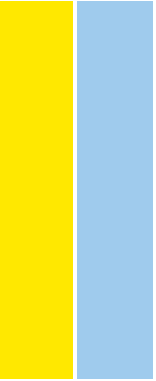
Catarina Rodrigues Carvalho

M
2025



MicroRNAs Associados às Vias de Biossíntese do Cortisol
e da Aldosterona: Potenciais Biomarcadores com
Implicações Médico-Legais.

Catarina Carvalho



CATARINA RODRIGUES CARVALHO

MicroRNAs Associados às Vias de Biossíntese do Cortisol e da Aldosterona: Potenciais Biomarcadores com Implicações Médico-Legais.

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

Orientadora: Doutora Ana Luísa Teixeira

Categoria: Investigadora Júnior | Professora Auxiliar Convidada

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

Coorientador: Professor Doutor Rui Medeiros

Categoria: Coordenador Grupo | Professor Catedrático Convidado

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

Coorientadora: Doutora Francisca Dias

Categoria: Investigadora Júnior

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

Informação Técnica

TÍTULO:

MicroRNAs Associados às Vias de Biossíntese do Cortisol e da Aldosterona:
Potenciais Biomarcadores com Implicações Médico-Legais.

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

AUTOR: Catarina Rodrigues Carvalho

DATA: setembro de 2025

EDITOR: Catarina Rodrigues Carvalho

CORREIO ELETRÓNICO: catarinacarv7@gmail.com

1ª EDIÇÃO: setembro de 2025

Agradecimentos

Ao concluir mais um importante passo do meu percurso académico, tenho de agradecer a todas as pessoas que estiveram comigo neste processo e que me ajudaram a superar esta etapa.

Em primeiro lugar, quero agradecer à direção do Mestrado em Medicina Legal, Professor Doutor Agostinho Santos e Professora Doutora Graça Lobo, e à Professora Doutora Maria José Pinto da Costa pela oportunidade de realização deste mestrado e por todo o conhecimento que me transmitiram.

À minha orientadora, Doutora Ana Luísa Teixeira, muito obrigada por ter aceite esta orientação e por toda a paciência, simpatia, disponibilidade e incentivo ao longo deste processo. Agradeço todos os ensinamentos que me transmitiu e que serão certamente úteis para o meu futuro.

Quero agradecer ao meu coorientador, Doutor Rui Medeiros, coordenador do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO Porto, pelo privilégio da concretização deste projeto.

À minha coorientadora, Doutora Francisca Dias, por toda a simpatia, disponibilidade e pelas sugestões fundamentais para o desenvolvimento deste projeto.

Quero agradecer a todo o Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO Porto, pelo acolhimento, pela ajuda que foi essencial no processo de integração e por toda a simpatia com que sempre me receberam. Em especial, à Mariana Ferreira por toda a ajuda e conselhos indispensáveis no decorrer de todo o trabalho laboratorial.

Agradeço a colaboração do Serviço de Química Clínica do IPO Porto pela ajuda na quantificação dos níveis de cortisol e aldosterona, sem os quais não seria possível realizar este trabalho.

Às minhas amigas de mestrado, obrigada por terem estado sempre presentes ao longo deste dois anos. A vossa companhia e apoio foram essenciais ao longo de todo este processo.

À minha melhor amiga, Inês, um obrigada do tamanho do mundo por sempre me apoiares e estares ao meu lado nos bons e maus momentos. Obrigada pelos conselhos, incentivos, risos, choros e paciência. A tua amizade será sempre fundamental para mim.

À minha afilhada, Filipa, que acompanhou este processo e tinha sempre algo pronto a dizer nos momentos em que me sentia mais desmotivada. Obrigada por estares presente, sempre disponível para me ouvir e por seres um enorme apoio para mim.

À minha irmã, Leonor, que sempre acreditou e confiou em mim. Obrigada pela motivação, por todas as palavras e momentos em que me tentavas distrair e fazer deixar de pensar em coisas más. Espero ser um exemplo para o teu percurso que começou agora e que me orgulha imenso.

Aos meus pais, obrigada por me terem ajudado a conseguir concretizar mais uma etapa tão importante para mim. Obrigada por toda preocupação, amor e por todos os sacrifícios que fizeram para que isto fosse possível. Sem vocês, não seria a pessoa que sou hoje.

Por último, às minhas três estrelinhas, Bisa, Avô Gaspar e Tio Zé, um agradecimento gigante por nunca me terem largado mesmo já não estando aqui fisicamente. Sei que estão a tomar conta de mim em todos os momentos e espero ser um orgulho para vocês.

A todos, o meu mais sincero obrigada.

Índice

Resumo	17
Abstract	21
1. Introdução	25
1.1. Intervalo <i>post mortem</i>	25
1.2. Relógios biológicos	28
1.3. Vias de produção hormonal	31
1.4. Regulação hormonal e a sincronização circadiana	33
1.5. microRNAs	36
2. Objetivos	42
2.1. Objetivo Principal	42
2.2. Objetivos Específicos	42
3. Materiais e Métodos	45
3.1. Seleção do perfil de miRNAs a analisar	45
3.2. População em estudo	45
3.3. Processamento de amostras	46
3.4. Extração de miRNA	46
3.5. Síntese de cDNA	47
3.6. Quantificação por qPCR em tempo real	47
3.7. Quantificação dos níveis de cortisol e de aldosterona	48
3.8. Análise Estatística	48
4. Resultados	52
4.1. Frequência de detecção dos miRNAs alvo nas amostras biológicas	52

4.2. Quantificação relativa da expressão do perfil de miRNAs ao longo do período de 24 horas	54
4.3. Associação dos níveis de cortisol e aldosterona e os níveis de expressão do perfil de miRNAs ao longo do dia	56
5. Discussão	64
6. Conclusão e Perspetivas Futuras	71
7. Referências Bibliográficas	75

Índice de Figuras

Figura 1: Mecanismo de regulação dos genes relógio.	30
Figura 2: Biossíntese do cortisol.	32
Figura 3: Biossíntese de aldosterona.	33
Figura 4: Variação diária das concentrações de cortisol e de aldosterona.	35
Figura 5: Biogénese dos miRNAs.	37
Figura 6: Colheita das amostras biológicas.	45
Figura 7: Curva de amplificação obtida no StepOne™ <i>qPCR Real-Time</i>	48
Figura 8: Frequência de deteção dos miRNAs alvo de estudo nas amostras de sangue, correspondentes aos períodos da manhã (a) e da tarde (b), e nas amostras de saliva, relativas ao período noturno (c).	53
Figura 9: Quantificação relativa ($-\Delta C_t$) dos miRNAs alvo de estudo nos 3 períodos do dia nas amostras de sangue periférico e saliva. * $P < 0,050$	55
Figura 10: Comparação entre os níveis de hsa-miR-125a-5p e os níveis de cortisol (a) e de aldosterona (b).	56
Figura 11: Comparação entre os níveis de hsa-miR-125b-5p e os níveis de cortisol (a) e de aldosterona (b).	57
Figura 12: Comparação entre os níveis de hsa-miR-193a-3p e os níveis de cortisol (a) e de aldosterona (b).	58
Figura 13: Comparação entre os níveis de hsa-miR-424 e os níveis de cortisol (a) e de aldosterona (b).	59
Figura 14: Comparação entre os níveis de hsa-miR-643 e os níveis de cortisol (a) e de aldosterona (b).	60
Figura 15: Relação dos miRNAs estudados com as vias de biossíntese de cortisol e da aldosterona.	68

Índice de Tabelas

Tabela 1: Valores de fold-change e P-value para o hsa-miR-125a-5p.	57
Tabela 2: Valores de fold-change e P-value para o hsa-miR-125b-5p.	58
Tabela 3: Valores de fold-change e P-value para o hsa-miR-193a-3p.	59
Tabela 4: Valores de fold-change e P-value para o hsa-miR-424.	60
Tabela 5: Valores de fold-change e P-value para o hsa-miR-643.	61

Abreviaturas

A

ACTH – hormona adrenocorticotrófica

AGO – proteína argonauta

APA – adenomas produtores de aldosterona

B

BMAL1 – *brain and muscle arnt-like protein – 1*

C

CCGs – *clock controlled genes*

cDNA – DNA complementar

CLOCK – *circadian locomotor output cycles kaput*

CRH – hormona libertadora de corticotropina

Ct – *cycle threshold*

CRY – *cryptochrome gene*

CYP11A1 – citocromo P450 da clivagem da cadeia lateral do colesterol

CYP11B1 – 11 β -hidroxilase

CYP11B2 – aldosterona sintase

CYP17A1 – 17 α -hidroxilase

CYP21 – 21-hidroxilase

D

DGCR8 – *DiGeorge syndrome critical region 8*

H

HMGCR – 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase

HPA – eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

I

IL-6 – interleucina 6

IPM – intervalo post mortem

K

K^+ – íão potássio

M

mRNA – RNA mensageiro

miRNA – microRNA

N

Na^+ – íão sódio

NF-kB – fator nuclear kappa B

NSQ – núcleo supraquiasmático

P

PER – *period gene*

Pri-miRNA – microRNA primário

Pre-miRNA – microRNA precursor

Q

qPCR – PCR quantitativo em tempo real

R

RISC – *RNA Induced Silencing Complex*

S

SCN – Sistema nervoso central

SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

T

TNF- α – fator de necrose tumoral α

TRAF6 – *Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6*

TRPB – *Transactivation-responsive RNA-Binding Protein*

X

XPO5 – exportina - 5

RESUMO

Resumo

A determinação do intervalo *post mortem* (IPM) é fundamental nas investigações forenses, pois ajuda a estimar o tempo decorrido entre a morte e a descoberta do cadáver, auxiliando na identificação de suspeitos e na verificação de álbis. No entanto, essa estimativa é desafiadora em consequência de múltiplos fatores, entre os quais o estado de decomposição dos corpos e as limitações dos métodos atuais, nomeadamente, a variabilidade interindividual e as alterações ambientais. Desta forma, torna-se essencial o desenvolvimento de abordagens mais robustas e reproduzíveis para determinar o IPM.

Uma abordagem promissora baseia-se na compreensão do funcionamento do organismo e, em particular, dos ritmos biológicos inerentes ao mesmo, que podem fornecer informação útil para a estimativa do IPM. Foi a partir deste princípio que surgiu a classificação e divisão em três tipos de ritmos biológicos: os ritmos ultradianos, infradianos e circadianos. Os ritmos circadianos, que ocorrem em ciclos de aproximadamente 24 horas e são influenciados pelos ciclos de luz, controlam funções fisiológicas e cognitivas, adaptando as mesmas para a hora do dia mais adequada. As vias de biossíntese hormonal são exemplo de ritmos circadianos e, entre estas, destacam-se as vias de biossíntese do cortisol e da aldosterona. O cortisol é uma hormona glucocorticóide fundamental para a homeostasia do organismo, desempenhando um papel crucial na resposta ao stress, na regulação do sistema imunitário e do metabolismo, incluindo a gluconeogénese. Por sua vez, a aldosterona é uma hormona mineralocorticóide que contribui de forma determinante para a manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e da pressão arterial, regulando a reabsorção de sódio e a excreção de potássio nos rins. Os níveis hormonais tanto do cortisol como da aldosterona seguem um ritmo circadiano bem definido, atingindo o pico de manhã e diminuindo ao longo do dia, apesar de a variação da aldosterona ser menos acentuada. A biossíntese destas hormonas é regulada por mecanismos epigenéticos, como os microRNAs, que controlam a expressão dos genes envolvidos no processo.

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificante que regulam a expressão génica pós-transcricional e destacam-se pela elevada estabilidade, o que permite a sua análise em amostras degradadas, tornando-os promissores para o processo de estimativa do IPM. Assim, a expressão de miRNAs envolvidos na produção de cortisol e de aldosterona pode constituir uma estratégia eficiente para essa determinação.

A análise dos ritmos circadianos do cortisol e da aldosterona, juntamente com a regulação dos mesmos por miRNAs, permite-nos obter um indicador fisiológico temporal

do organismo. Dado que estes marcadores apresentam variações previsíveis ao longo do dia, o estudo dos seus níveis *post mortem* pode indicar aproximadamente o período do dia em que ocorreu a morte. Comparando os perfis de expressão de miRNAs observados com os padrões circadianos hormonais, é possível estimar o IPM de forma mais precisa, fornecendo uma ferramenta complementar e potencialmente mais confiável para as investigações forenses.

O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de expressão de miRNAs associados às vias de síntese do cortisol e da aldosterona, em amostras de sangue periférico e saliva, de modo a avaliar se podem ser considerados potenciais biomarcadores do ritmo circadiano, para aplicação na estimativa do IPM. Primeiramente, procedeu-se à definição do perfil de miRNAs a ser analisado, tendo sido selecionados os hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-424 e hsa-miR-643 para o presente estudo. Foram realizadas colheitas de sangue periférico e de saliva a 20 indivíduos saudáveis, sendo que essas mesmas amostras passaram por um processo de extração de miRNAs, após terem sido devidamente processadas. Seguidamente, realizou-se a síntese de DNA complementar (cDNA) e quantificação do perfil de miRNAs através da técnica de qPCR em tempo real.

Os resultados deste estudo mostraram que todos os miRNAs selecionados foram detetados em ambos os fluídos biológicos e apresentaram padrões temporais heterogêneos ao longo do dia, embora se tenha identificado uma tendência comum entre os períodos da tarde e da noite. Os miRNAs hsa-miR-125a-5p e hsa-miR-424 apresentaram um comportamento semelhante, com uma ligeira redução da expressão da manhã para a tarde, seguida de um aumento acentuado entre os períodos da tarde e da noite. Por outro lado, o hsa-miR-193a-3p e o hsa-miR-643 evidenciaram um aumento gradual ao longo do dia, sendo mais intenso no intervalo entre a tarde e a noite. Quanto ao hsa-miR-125b-5p, os níveis de expressão mantiveram-se relativamente constantes durante a manhã e a tarde, tendo sido registado, um aumento significativo à noite, refletindo o padrão observado nos restantes miRNAs. Esta evolução foi contrastante com a dinâmica observada no cortisol e na aldosterona, que viram os seus níveis diminuir ao longo do dia. Através desta comparação, foi possível estabelecer que existe um mecanismo de regulação por feedback, onde os miRNAs funcionam como reguladores negativos na produção destas hormonas, podendo então ser considerados potenciais biomarcadores úteis na determinação do IPM.

ABSTRACT

Abstract

The determination of the post-mortem interval (PMI) is a fundamental aspect of forensic investigations, as it helps estimate the time elapsed between death and the discovery of the body, assisting in the identification of suspects and the verification of alibis. However, this estimation is challenging due to multiple factors, including the state of body decomposition and the limitations of current methods, namely interindividual variability and environmental influences. Therefore, the development of more robust and reproducible approaches for PMI determination is essential.

A promising strategy is based on understanding the functioning of the organism and, in particular, its inherent biological rhythms, which can provide valuable information for PMI estimation. From this concept, biological rhythms have been classified into three categories: ultradian, infradian and circadian rhythms. Circadian rhythms, which occur in cycles of approximately 24 hours and are influenced by light–dark cycles, regulate physiological and cognitive functions, adapting them to the most appropriate time of day. Hormone biosynthesis pathways are a prime example of circadian rhythms, with cortisol and aldosterone biosynthesis pathways being particularly noteworthy. Cortisol, a glucocorticoid hormone, plays a key role in maintaining homeostasis, contributing to stress response, immune regulation and metabolism, including gluconeogenesis. Aldosterone, in turn, is a mineralocorticoid hormone that is crucial for maintaining electrolyte balance and blood pressure, regulating sodium reabsorption and potassium excretion in the kidneys. Both cortisol and aldosterone exhibit well-defined circadian patterns, peaking in the morning and declining throughout the day, although the variation in aldosterone levels is less pronounced. The biosynthesis of these hormones is regulated by epigenetic mechanisms, such as microRNAs, which control the expression of the genes involved in these processes.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that regulate gene expression post-transcriptionally and are notable for their high stability, allowing their analysis even in degraded samples. This makes them promising tools for PMI estimation. Therefore, assessing the expression of miRNAs involved in cortisol and aldosterone production could represent an effective strategy for determining PMI.

Analyzing the circadian rhythms of cortisol and aldosterone, alongside their regulation by miRNAs, provides a temporal physiological indicator of the organism. Since these markers exhibit predictable variations throughout the day, studying their post-mortem levels may offer an approximation of the time of death. By comparing observed miRNA expression

profiles with known hormonal circadian patterns, PMI can be estimated more accurately, providing a complementary and potentially more reliable tool for forensic investigations.

The aim of this study was to analyze the expression profiles of miRNAs associated with cortisol and aldosterone biosynthesis pathways in peripheral blood and saliva samples, in order to evaluate their potential as circadian biomarkers for PMI estimation. Initially, the miRNA profile to be analyzed was defined, selecting hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-424, and hsa-miR-643 for this study. Peripheral blood and saliva samples were collected from 20 healthy individuals, followed by miRNA extraction after appropriate sample processing. Subsequently, complementary DNA (cDNA) synthesis and miRNA quantification were performed using real-time quantitative PCR (qPCR).

The results showed that all selected miRNAs were detectable in both biological fluids and exhibited heterogeneous temporal patterns throughout the day, although a common trend was observed between the afternoon and evening. hsa-miR-125a-5p and hsa-miR-424 displayed similar behavior, with a slight decrease in expression from morning to afternoon, followed by a pronounced increase between the afternoon and night. In contrast, hsa-miR-193a-3p and hsa-miR-643 demonstrated a gradual increase throughout the day, which was more pronounced between the afternoon and evening. For hsa-miR-125b-5p, expression levels remained relatively stable during the morning and afternoon, followed by a significant increase at night, reflecting the pattern observed for the other miRNAs. This progression contrasted with the dynamics observed for cortisol and aldosterone, which decreased over the course of the day. Through this comparison, it was possible to establish the presence of a feedback regulation mechanism, in which miRNAs act as negative regulators of hormone production. Consequently, these miRNAs may be considered potential biomarkers useful for PMI determination.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Intervalo *post mortem*

Desde a Antiguidade, as sociedades recorreram à medicina para responder a questões que ultrapassavam o domínio clínico, estendendo-se igualmente ao âmbito judicial. A relação entre a medicina e a justiça encontra-se já documentada em documentos antigos gregos e romanos, onde a avaliação de lesões corporais era utilizada com finalidades legais, servindo como prova em tribunais em casos de envenenamento ou morte suspeita, por exemplo (1). Ao longo dos séculos seguintes, tornou-se cada vez mais evidente que a observação sistemática da morte e dos fenómenos a ela associados era essencial para o funcionamento da justiça, o que acabou por conduzir, apenas com o progresso do conhecimento científico, à consolidação daquilo a que hoje chamamos Medicina Legal, a área que coloca o saber médico ao serviço da lei (2).

À medida que a Medicina Legal se consolidava, foi sendo possível reconhecer que a simples observação de um cadáver não era suficiente para fornecer respostas confiáveis aos tribunais. Nos primórdios dos estudos médico-legais, a avaliação da morte baseava-se simplesmente na análise de sinais externos, como a palidez e a ausência de respiração, indicações estas que estavam dependentes da interpretação de cada perito (1, 2). Esta incerteza que se gerava quanto ao momento do óbito tinha implicações diretas na justiça, o que conduziu à necessidade de desenvolver métodos mais sistemáticos para estudar os fenómenos cadavéricos, abrindo caminho para o que viria a ser o estudo científico do intervalo *post mortem* (IPM) (3).

Autores como Paolo Zacchia, considerado o “pai da Medicina Legal”, destacaram a importância de sistematizar a análise de sinais cadavéricos, incluindo a rigidez, designada de *rigor mortis*, os livores, o chamado *livor mortis*, e a putrefação, procurando estabelecer uma ligação com o tempo decorrido após a morte, introduzindo, assim, noções de padronização nesta área (4, 5).

A determinação do intervalo *post mortem* (IPM) constitui um dos pilares fundamentais nas ciências forenses, desempenhando um papel central na reconstrução cronológica dos eventos relacionados com a morte de um indivíduo. Este parâmetro caracteriza-se pela obtenção de uma estimativa do tempo decorrido entre o instante em que ocorreu o óbito e o momento em que o respetivo cadáver é encontrado (6). Dada a dificuldade e as limitações que existem em determinar com precisão a hora exata em que ocorreu a morte de um indivíduo, recorre-se à estimativa do IPM como ferramenta auxiliar nas investigações

forenses, uma vez que esta pode contribuir de forma decisiva para, por exemplo, a verificação da credibilidade de álibis e identificação de potenciais suspeitos (7).

Atualmente, segundo a prática médico-legal convencional, a estimativa do IPM tem-se baseado em métodos que envolvem a observação de alterações macroscópicas, como *rigor mortis*, *livor mortis*, *algor mortis* (diminuição da temperatura corporal) e alterações oculares (8). Estes parâmetros permitem fazer uma estimativa razoável do IPM, principalmente nas primeiras 24 horas após a ocorrência do óbito, mas vão-se tornando progressivamente menos fiáveis e sensíveis com o decorrer do tempo, devido ao impacto de fatores extrínsecos e intrínsecos ao indivíduo (6, 8). O ritmo a que o *rigor mortis* se instala num cadáver depende de fatores como a temperatura ambiente, o estado nutricional do indivíduo e a causa da morte, enquanto que o *livor mortis* pode ser condicionado pela posição do corpo, possíveis lesões que tenham sido causadas antes ou após o óbito e a temperatura do meio envolvente (9). Já o *algor mortis*, para além de ser modelado pela temperatura ambiente à semelhança dos parâmetros anteriormente referidos, é igualmente influenciado pela humidade e ventilação do local e pelo vestuário da vítima, sendo que, para aumentar a precisão da estimativa com base na taxa de arrefecimento, foram desenvolvidos modelos matemáticos como o Modelo de Henssge (9, 10). Este método matemático constitui uma ferramenta quantitativa amplamente utilizada para estimar o IPM a partir do arrefecimento cadavérico. Segundo esta abordagem, a estimativa baseia-se na medição da temperatura retal do cadáver, que é posteriormente comparada com a temperatura ambiente (11). Estes valores são relacionados com fatores de correção, como o peso do corpo, o vestuário do indivíduo e as condições ambientais, sendo aplicados num nomograma (12). Embora seja reconhecido como um procedimento útil e relativamente preciso no cálculo do IPM, a sua aplicação prática mostra-se frequentemente condicionada, já que está dependente de condições controladas, nomeadamente uma temperatura ambiente estável, que nem sempre se verifica em contextos forenses reais (11). Adicionalmente, a precisão deste método diminui significativamente à medida que o tempo *post mortem* se prolonga (12).

Apesar de constituírem ferramentas de referência na prática médico-legal, estes métodos referidos acima apresentam várias limitações. A variabilidade interindividual, a influência das condições ambientais e a dependência de contextos particulares, como no caso do modelo de Henssge, limitam frequentemente a fiabilidade das estimativas (8). Além disso, à medida que o IPM se prolonga, estas alterações tornam-se menos evidentes e mais difíceis de interpretar, reduzindo drasticamente a sua utilidade prática (6). Assim, torna-se fundamental recorrer a métodos complementares que ofereçam maior robustez

em fases mais avançadas da decomposição, entre os quais se destaca a entomologia forense (13).

A entomologia forense consiste no estudo dos insetos que colonizam cadáveres, baseando-se no princípio de que a colonização é feita de forma sequencial e previsível, permitindo determinar o tempo decorrido desde a morte (14). A análise envolve a coleta sistemática de insetos, a identificação das espécies presentes e a avaliação do estágio de desenvolvimento das mesmas, algo que está diretamente relacionado com o avanço da decomposição do corpo (15). Entre os insetos mais utilizados nesta técnica, destacam-se, como primeiros colonizadores, as moscas da família Calliphoridae, como *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria*, e, posteriormente, os besouros da família Silphidae, que se alimentam dos tecidos em decomposição ou mesmo das larvas de mosca (16, 17). O estudo dos estágios larvares das moscas é crucial para este procedimento, uma vez que cada fase de desenvolvimento está associada às condições ambientais, permitindo calcular o tempo mínimo desde a oviposição, oferecendo uma estimativa confiável do IPM (16). A presença de pupas ou de insetos adultos possibilita ainda inferir fases mais avançadas da decomposição (17). Apesar da sua utilidade, a entomologia forense apresenta limitações: a colonização dos cadáveres pode ser afetada por fatores ambientais como a temperatura, a humidade, a exposição ao sol ou ao vento, bem como pela presença de barreiras físicas ou químicas que retardem a chegada dos insetos (14). Além disso, a interpretação do desenvolvimento dos insetos depende do conhecimento detalhado das espécies locais, sendo a aplicação do método menos precisa em contextos com espécies pouco estudadas ou em condições ambientais extremas (14). Por estas razões, a entomologia forense deve ser utilizada como método complementar, integrando-se com outras técnicas de estimativa do IPM para aumentar a robustez das investigações.

Tendo em conta a falta de uniformização e de standardização que este processo ainda sofre, devido à inexistência de um método universal e preciso em todos os contextos, tem-se impulsionado a pesquisa de novas abordagens, nomeadamente técnicas bioquímicas e moleculares, que mostram ser replicáveis nos diferentes cenários forenses, por exemplo, pela maior resistência que apresentam aos efeitos da decomposição cadavérica e a fatores ambientais (10, 18). Contudo, estes processos ainda exigem padronização e validação para se tornarem fiáveis no contexto de uma investigação forense (10).

Neste seguimento, têm surgido diversas linhas de investigação que procuram explorar marcadores moleculares e bioquímicos como alternativas mais fiáveis para a estimativa do IPM. A fragmentação progressiva do RNA tem sido estudada como um possível indicador temporal, dado que a degradação *post mortem* destas moléculas segue um padrão

relativamente consistente, permitindo associar o seu estado de fragmentação com o tempo decorrido após a morte (19). Para além disso, as proteínas também têm sido alvo de investigação, uma vez que, após o óbito, sofrem degradação ou modificações químicas previsíveis, como a perda progressiva de atividade enzimática ou fragmentação em moléculas mais pequenas (20). Apesar de ainda se encontrarem em fase experimental e de carecerem de validação, estes estudos demonstram o potencial destas abordagens para complementar e, no futuro, talvez superar as limitações dos métodos tradicionais.

Assim, compreender a forma como o organismo funciona, nomeadamente através da exploração dos ritmos biológicos, poderá constituir um meio complementar promissor com aplicabilidade na estimativa do IPM.

1.2. Relógios biológicos

A existência de ritmos biológicos nos seres vivos tem sido reconhecida desde a Antiguidade, estando evidenciada pela identificação de padrões regulares no comportamento dos organismos, como os hábitos migratórios das aves ou os ciclos de abertura e fecho de flores em momentos específicos do dia (21). No entanto, foi apenas durante o século XX que o conceito de “relógio biológico” passou a ser abordado numa perspetiva científica, permitindo uma melhor compreensão daquilo que são os mecanismos de funcionamento dos ritmos endógenos (22). Estes relógios biológicos regulam de forma cíclica um conjunto de processos fisiológicos inerentes ao organismo através da sincronização com estímulos ambientais, entre os quais a luz e a temperatura (21). A ocorrência de ciclos naturais, como o dia e a noite, as variações das marés e as estações do ano, levou a que as espécies desenvolvessem um conjunto de comportamentos adaptativos que lhes permitiria viver de acordo com as mudanças cíclicas (22).

A compreensão do funcionamento dos relógios biológicos passa também pela identificação dos diferentes tipos de ritmos que estruturam a atividade biológica dos organismos e, foi segundo este princípio que Franz Halberg definiu três tipos de ritmos: os ritmos ultradianos, infradianos e circadianos (23). Os ritmos ultradianos caracterizam-se por ocorrerem num período inferior a 24 horas, ou seja, são de frequência elevada, podendo repetir-se várias vezes ao dia. São exemplos deste tipo de oscilações os ciclos de sono e os batimentos cardíacos (24, 25). Os ritmos infradianos correspondem aos ciclos cuja duração excede as 24 horas e podem manifestar-se em períodos semanais, mensais ou sazonais, como é o caso do ciclo menstrual (26). Já os ritmos circadianos são

caracterizados pela sua ocorrência em ciclos de aproximadamente 24 horas, ou seja, praticamente simultâneos ao período do movimento de rotação da Terra (27). As vias de secreção hormonal e as variações da temperatura corporal ao longo do dia constituem exemplos deste tipo de ritmicidade (28).

O estudo sistemático dos ritmos circadianos começou a ganhar relevo durante o século XX, quando se comprovou a existência deste tipo de ritmicidade biológica autônoma, a partir do facto de as espécies continuarem a demonstrar comportamentos específicos, mesmo na ausência de estímulos externos (29). Um dos primeiros indícios da ritmicidade interna foi observado na botânica, onde se verificava que plantas abriam e fechavam as folhas segundo um ritmo previsível, mesmo quando mantidas em condições de ausência de luz, evento este que apontava para a existência de um mecanismo endógeno capaz de regular os processos biológicos de forma independente dos fatores ambientais (29).

Após várias décadas de investigação, foram identificadas estruturas específicas que participavam e coordenavam a regulação destes ritmos circadianos (22). Trabalhos desenvolvidos por Curt Richter em que se avaliaram lesões progressivas do sistema nervoso central (SCN), tendo em conta a permanência ou a supressão da ritmicidade diária em ratinhos, revelaram que o responsável pela coordenação destes ritmos estava no hipotálamo (30). Na sequência desta descoberta, Robert Moore avançou com a hipótese de que o fator ambiental mais importante para a ritmicidade seria o ciclo claro-escuro e partiu para a investigação do papel da visão na regulação desse mesmo ciclo, tendo conseguido descrever a via retino-hipotalâmica, que terminava numa estrutura localizada na base do cérebro: o núcleo supraquiasmático (NSQ) (31). O NSQ situa-se no hipotálamo anterior, acima do quiasma ótico, local esse que é estratégico para que o núcleo possa receber informações visuais acerca da existência ou não de luz, através de conexões neurais com a retina (32, 33).

Embora já se reconhecesse que o NSQ era a estrutura central da coordenação do ritmo circadiano, apenas na década de 70 do século passado, com o avanço da biologia molecular, se começou a compreender quais os mecanismos genéticos subjacentes à regulação da ritmicidade endógena. Um dos pontos iniciais desta investigação surgiu através de estudos com a mosca *Drosophila melanogaster*, onde foram identificadas mutações num gene específico, que causavam alterações no período dos ritmos endógenos e que, conseqüentemente, afetavam o padrão circadiano deste organismo. Assim, foi identificado o primeiro gene relógio: o gene *period* (*PER*) (31). Posteriormente, ao longo dos anos seguintes e com o desenvolvimento das técnicas moleculares, foram identificados mais três genes que participavam ativamente na regulação genética da

ritmicidade circadiana: *cryptochrome (CRY)*, *brain and muscle arnt-like protein – 1 (BMAL1)* e *circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK)* (34).

Compreender a forma como estes genes atuam é crucial para entender o funcionamento do ritmo circadiano, visto que estes codificam fatores de transcrição que iniciam e mantêm os ciclos de expressão génica e de processos celulares rítmicos ativos no organismo. Estes genes são divididos em dois tipos de reguladores: reguladores positivos (*CLOCK* e *BMAL1*) e reguladores negativos (*CRY* e *PER*) (35). Num primeiro mecanismo de *feedback*, os genes reguladores positivos codificam fatores de transcrição que, após se ligarem e formarem o dímero *CLOCK:BMAL1*, se vão acoplar a regiões promotoras do DNA, os promotores E-box, que, por sua vez, vão aumentar a transcrição dos genes reguladores negativos. As proteínas resultantes da transcrição dos genes *CRY* e *PER* vão acumular-se no citoplasma e formam complexos que reentram no núcleo e inibem a atividade de *CLOCK:BMAL1*. Para que um novo ciclo de 24 horas se inicie, o nível de produção das proteínas *CRY* e *PER* tem de diminuir, permitindo que os reguladores positivos sejam novamente transcritos (35). Este mecanismo é reforçado por um *feedback* adicional que controla a transcrição do regulador positivo *BMAL1*, mediado pelos genes *Reverb α* e *Ror α* . Em paralelo, a transcrição dos *clock controlled genes (CCGs)* é também coordenada por este sistema molecular, levando à secreção proteínas envolvidas em processos fundamentais da regulação do NSQ, como recetores hormonais e neurotransmissores, contribuindo, consequentemente, para a regulação do ritmo circadiano (Figura 1) (22).

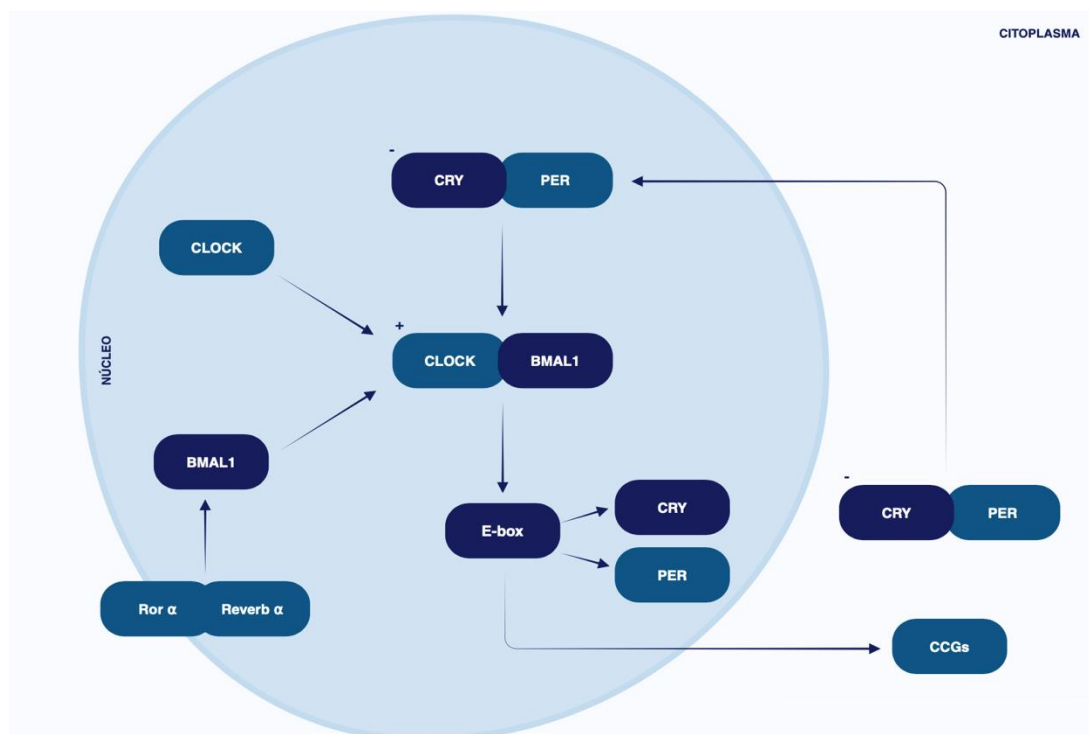


Figura 1: Mecanismo de regulação dos genes relógio.

1.3. Vias de produção hormonal

A articulação entre os ritmos biológicos e as funções vitais do organismo revela-se particularmente evidente no funcionamento do sistema endócrino. De entre os vários processos fisiológicos fundamentais, os mecanismos hormonais destacam-se pela sua oscilação temporal regular e pela dependência da regulação circadiana, mediada pelos genes relógio (36). As vias de síntese e secreção hormonal são, por isso, consideradas exemplos de ritmos circadianos, capazes de se ajustar ao ciclo claro-escuro e contribuir para a homeostasia do organismo ao longo das 24 horas diárias (36). De entre as várias vias de produção hormonal existentes no organismo humano, há duas que é possível destacar como exemplos de estarem associadas a ritmos circadianos, nomeadamente as vias de biossíntese do cortisol e da aldosterona.

O cortisol é uma hormona glucocorticóide que está profundamente envolvida na manutenção da homeostasia, tendo influência em várias funções biológicas e em quase todos os tecidos do organismo humano (37, 38). Algumas das principais funções do cortisol incidem na resposta ao stress, onde o glucocorticóide auxilia o organismo a adaptar-se a situações adversas através de processos metabólicos e imunológicos (39), na manutenção da resposta imune, induzindo a apoptose de células T pró-inflamatórias (40), por exemplo, e na regulação do metabolismo, onde coordena algumas vias metabólicas, como é o caso da gluconeogénese (40).

A biossíntese do cortisol ocorre na zona fasciculada do córtex da glândula suprarrenal e é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, tendo como precursor o colesterol. Em contextos de maior exigência fisiológica, como em situações de stress, o hipotálamo segrega a hormona libertadora de corticotropina (CRH), que estimula a hipófise anterior a libertar a hormona adrenocorticotrófica (ACTH). Esta, por sua vez, atua sobre a glândula suprarrenal, promovendo a síntese e secreção de cortisol (33). O processo inicia-se com a conversão do colesterol em pregnenolona, catalisada pela enzima mitocondrial CYP11A1, também designada P450_{scc}. Seguidamente, a pregnenolona sofre sucessivas transformações, sendo metabolizada pelas enzimas 17 α -hidroxilase (CYP17A1) e 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD), originando, respetivamente, 17 α -hidroxipregnenolona e 17 α -hidroxiprogesterona. Esta última é então convertida em 11-desoxicortisol pela ação da 21-hidroxilase (CYP21), e finalmente, através da ação da 11 β -hidroxilase (CYP11B1), dá-se a formação do cortisol (Figura 2) (41).

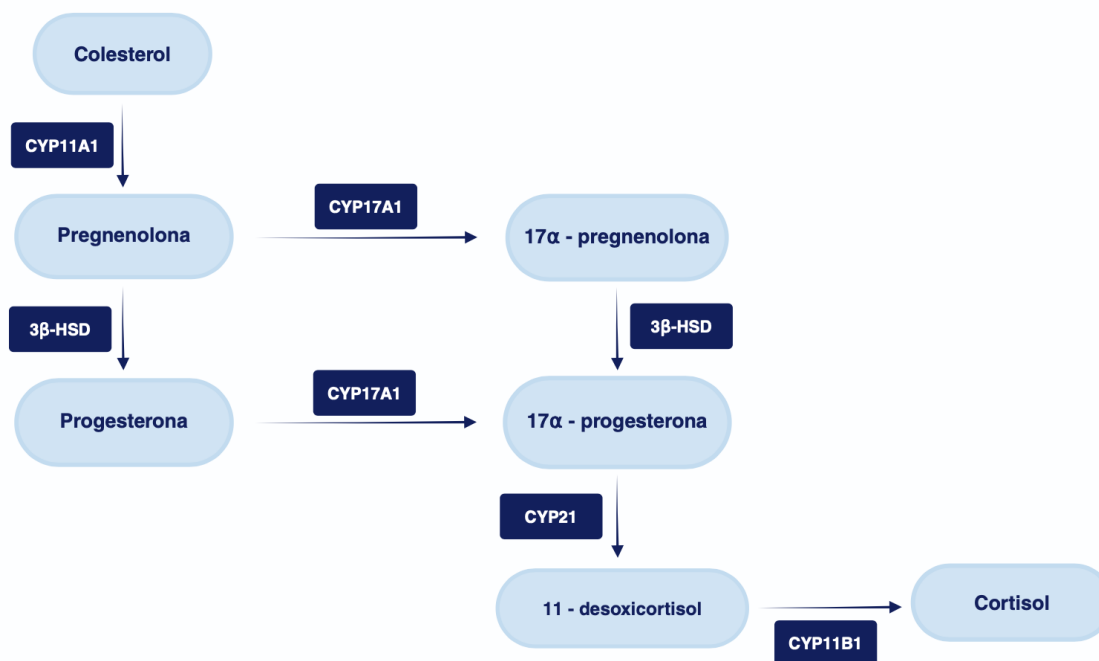


Figura 2: Biossíntese do cortisol.

A aldosterona é uma hormona esteroide da classe dos mineralocorticoides, produzida também na glândula suprarrenal, à semelhança do cortisol, mas desta vez na zona glomerulosa do córtex da glândula. Esta desempenha um papel essencial na regulação da homeostasia hidroeletrolítica e da pressão arterial, atuando primeiramente ao nível do rim, embora os seus efeitos se façam sentir de forma sistémica (42). De entre as suas principais funções destacam-se a regulação da reabsorção de sódio (Na^+) e excreção de potássio (K^+), contribuindo, assim, para a manutenção do volume sanguíneo e pressão arterial (42).

A secreção de aldosterona é um processo regulado principalmente pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) onde se desencadeia uma cascata hormonal, através da libertação de renina pelos rins, culminando na estimulação da glândula suprarrenal para se dar a produção de aldosterona (43).

De forma semelhante ao cortisol, a biossíntese da aldosterona tem como precursor o colesterol, que inicialmente é metabolizado pela enzima CYP11A1, originando pregnenolona. Posteriormente, a pregnenolona é convertida em progesterona pela ação da 3β -HSD, que é, por sua vez, transformada em 11-desoxicorticosterona através da enzima CYP21. Esta molécula sofre então a ação da CYP11B1, dando origem à corticosterona. A etapa final deste processo consiste na conversão da corticosterona em aldosterona, mediada pela enzima CYP11B2 (aldosterona sintase), por meio de reações de hidroxilação e oxidação (Figura 3) (33).

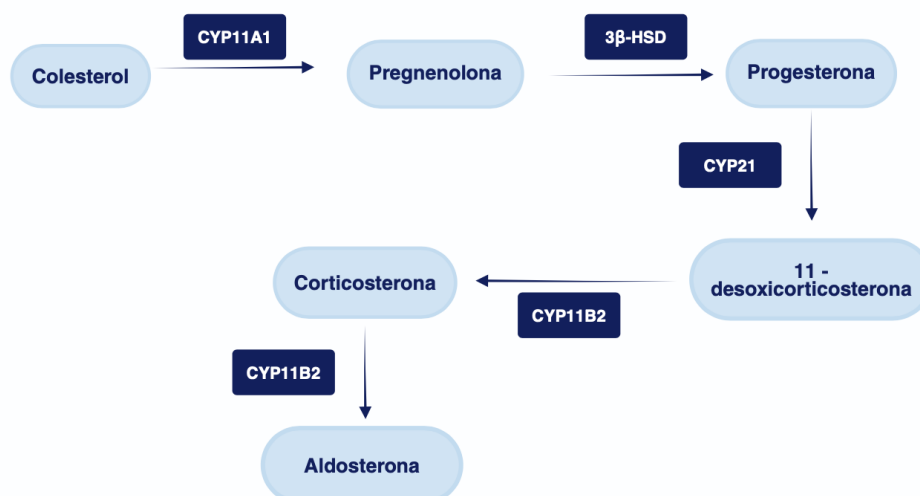


Figura 3: Biossíntese da aldosterona.

1.4. Regulação hormonal e a sincronização circadiana

Investigações recentes têm procurado explorar o papel de diferentes hormonas na estimativa do IPM, destacando-se, entre elas o cortisol e possivelmente a aldosterona (44-46). Estas moléculas, para além dos seus importantes papéis na regulação do organismo, apresentam padrões de variação ao longo do dia, regulados pelo ritmo circadiano, o que as torna potencialmente úteis em contexto forense (22).

Alguns estudos têm investigado o cortisol como um potencial marcador forense, nomeadamente, um trabalho de Martínez-Jiménez e colaboradores, onde se estabeleceu uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de cortisol medidos em amostras cadavéricas e o IPM estimado, observando também que os valores hormonais eram influenciados pela gravidade do edema pulmonar responsável pelo óbito (44). Estes resultados sugerem que o cortisol pode fornecer informações relevantes não só sobre o tempo decorrido desde a morte, mas também sobre a causa do óbito (44). Para além disso, Ackermann e colaboradores mostraram que o cortisol apresenta potencial como biomarcador circadiano para estimar o momento de deposição de vestígios biológicos em contexto forense (45). Apesar de sofrer alguma degradação ao longo do tempo, esta hormona pode indicar de forma confiável em que período do dia uma amostra biológica foi depositada, possibilitando uma análise mais robusta quando conjugado com outros biomarcadores, como a melatonina (45).

Em contrapartida, a aldosterona ainda é relativamente pouco estudada no contexto da investigação forense. Contudo, sabe-se que esta hormona é também regulada pelo ritmo circadiano, apresentando variações previsíveis ao longo do dia, o que levanta a possibilidade de ser um biomarcador interessante para o contexto da determinação do IPM (47).

Por isso, durante o estudo do ritmo circadiano, mais concretamente com vista a ser aplicado no cálculo do IPM, é interessante analisar as variações das duas hormonas referidas acima, já que ambas apresentam um padrão circadiano muito característico (22).

No caso do cortisol, em indivíduos saudáveis, observa-se uma oscilação diária bem definida, onde a concentração mais elevada se verifica nas primeiras horas da manhã, ao acordar. Ao longo do dia, os níveis do glucocorticóide vão diminuindo progressivamente, atingindo um valor mínimo durante a noite, o que favorece o estado de repouso (Figura 4) (48). No entanto, esta variação circadiana pode ser alterada em determinadas condições patológicas. No síndrome de Cushing, por exemplo, verifica-se a perda do ritmo normal, com níveis de cortisol persistentemente elevados, não sendo possível observar uma variação diária, enquanto que na doença de Addison há uma produção insuficiente da hormona, observando-se níveis mais baixos do que o considerado normal (49, 50). Também em patologias como depressão ou Alzheimer pode ocorrer uma atenuação da oscilação circadiana hormonal, evidenciando a sensibilidade do cortisol a contextos clínicos específicos (51).

A aldosterona apresenta também um padrão circadiano bem definido, apesar de as variações serem menos acentuadas do que no cortisol. Os níveis de aldosterona tendem a ser mais elevados durante a manhã e vão diminuindo gradualmente até ao início da madrugada, onde atingem os valores mais baixos (Figura 4) (47). No entanto, à semelhança do que acontece com o cortisol, a produção de aldosterona também pode ser influenciada no caso da existência de patologias específicas. Destaca-se o síndrome de Conn (hiperaldosteronismo primário), onde a produção de aldosterona se torna excessiva e contínua, suprimindo a variação normal ao longo do dia (52).

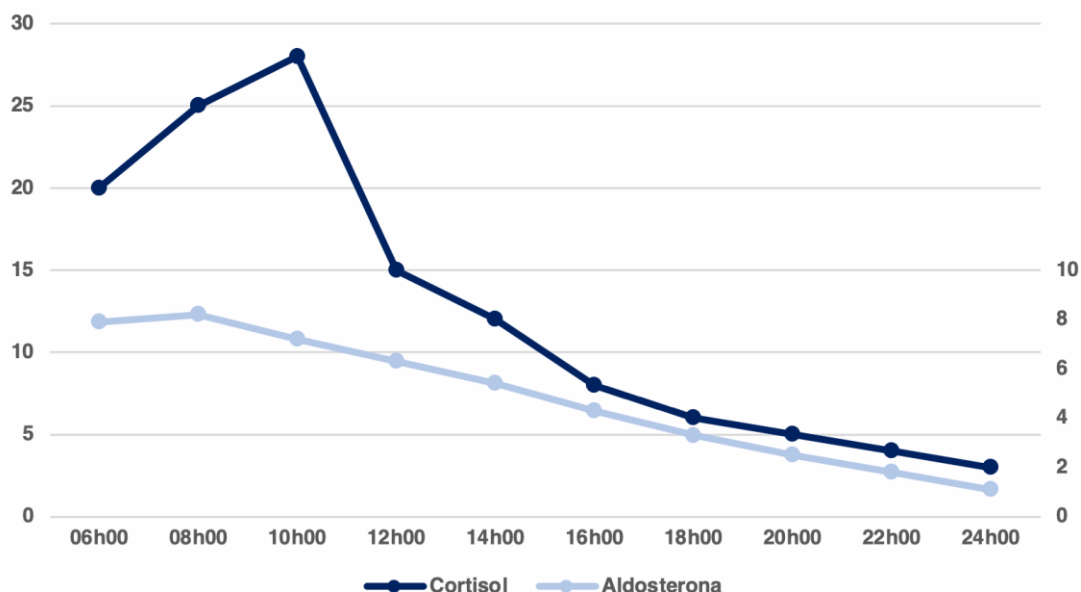


Figura 4: Variação diária das concentrações de cortisol e de aldosterona.

A associação da análise do cortisol e da aldosterona surge como uma estratégia promissora, uma vez que a combinação destas hormonas pode fornecer um perfil hormonal mais robusto para a estimativa do IPM, compensando limitações que cada biomarcador possa apresentar quando aplicado de forma isolada (53). Embora a variação diária da aldosterona seja menos acentuada do que a do cortisol, o seu padrão circadiano consistente permite que esta hormona funcione como um biomarcador complementar, reforçando a fiabilidade da estimativa em diferentes cenários forenses (53).

O futuro da determinação do IPM aponta para a integração de múltiplos tipos de biomarcadores, de modo a construir perfis temporais mais completos, robustos e fiáveis. Neste contexto, os microRNAs destacam-se também como ferramentas promissoras, uma vez que muitos estão envolvidos na regulação de hormonas, como o cortisol e a aldosterona (54). A combinação da análise hormonal com microRNAs poderá permitir uma abordagem mais completa, aumentando a precisão na estimativa do IPM, mesmo em fases avançadas de decomposição ou em situações complexas.

1.5. microRNAs

Durante os processos de síntese do cortisol e da aldosterona estão envolvidos mecanismos de regulação epigenéticos que controlam os genes que codificam as enzimas envolvidas em todo o processo, como é o caso da CYP11B1, CYP17A1, CYP21 e CYP11B2 (41). De entre esses mecanismos de regulação, salientam-se os microRNAs.

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificante, de cadeia simples, constituídas por 18 a 24 nucleótidos (55, 56). Esta classe de moléculas está envolvida na regulação génica pós-transcricional de praticamente todas as células eucarióticas (57), através da degradação de moléculas-alvo de RNA mensageiro (mRNA) ou da repressão da tradução das mesmas (58, 59).

O processo de biogénese dos miRNAs (Figura 5) inicia-se no núcleo, onde os genes codificadores de miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, dando origem ao precursor de miRNA primário, o pri-miRNA (57). Estes transcritos são processados por um complexo enzimático constituído pela ribonuclease III, Drosha, e uma proteína de ligação ao RNA, DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*), originando os microRNAs precursores (pre-miRNAs), com uma estrutura de stem-loop. Os pre-miRNAs são transportados para o citoplasma, através da enzima exportina-5 (XPO5), onde uma nova proteína, Dicer, em associação com o TRPB (*Transactivation-responsive RNA-Binding Protein*), atua sobre os mesmos, cortando a parte em loop da estrutura, formando, assim, um duplex de miRNA maturado, constituído pela cadeia madura de miRNA e a sua complementar (60). Posteriormente, de maneira a que os miRNAs possam atuar na regulação génica, a cadeia dupla é incorporada no complexo RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) e associada à proteína argonauta (AGO), para que se dê a separação das duas cadeias de miRNA. Uma das cadeias sofre degradação e a outra continua conjugada ao RISC e é encaminhada para o RNA mensageiro (mRNA) alvo (61).

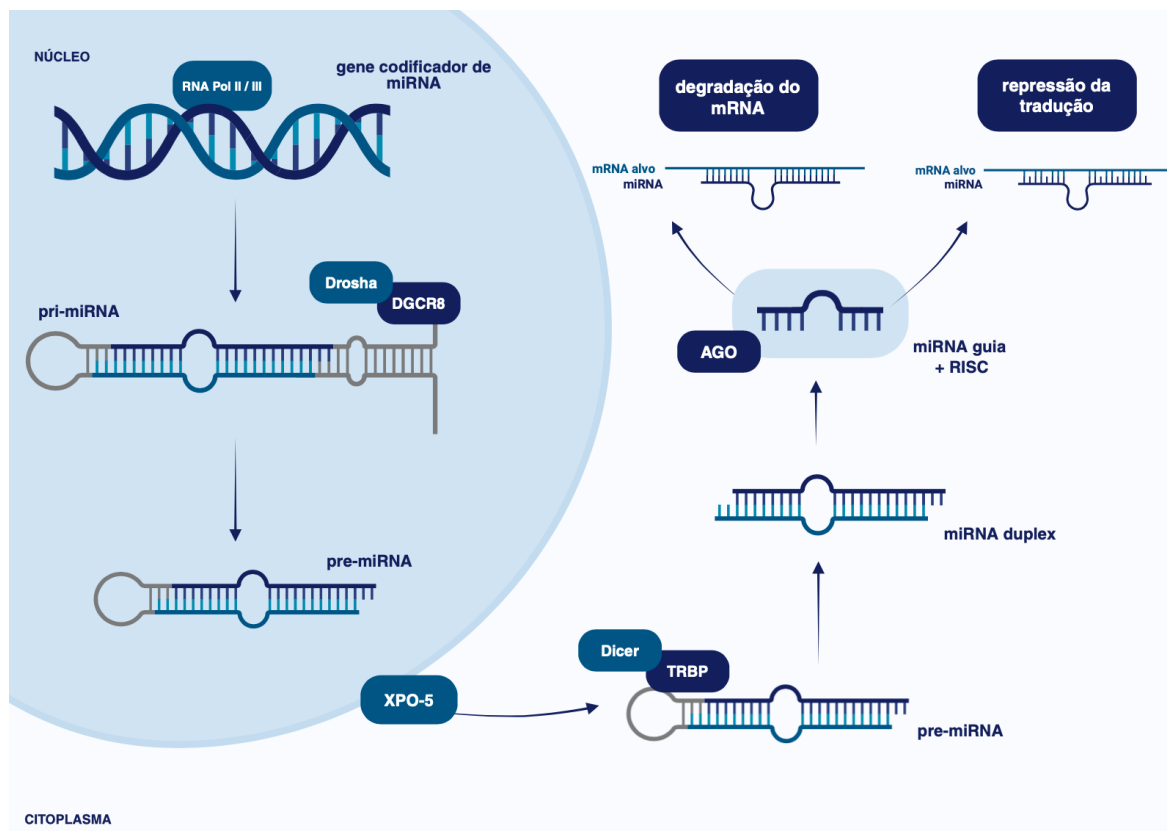


Figura 5: Biogênese dos miRNAs.

O método em que a regulação génica vai ocorrer dependerá do grau de complementaridade entre o miRNA maduro e o mRNA alvo: caso a complementaridade seja total, o miRNA atua através da degradação da molécula de mRNA, ou, quando existe uma complementaridade parcial, ocorre a inibição da tradução (33).

Os miRNAs destacam-se pela sua estabilidade, que pode ser atribuída a algumas características intrínsecas e extrínsecas associadas a estas moléculas. Entre essas características, destacam-se o pequeno tamanho destas estruturas (62), o facto de se encontrarem frequentemente armazenados em exossomas, que ajudam a proteger os miRNAs do ambiente extracelular (63), e a sua associação a complexos proteicos, como o RISC, que, para além de assegurar a funcionalidade das moléculas no processo de regulação génica, confere-lhes resistência através da proteção contra agentes de degradação, tal como a temperatura e o pH (64). Esta estabilidade permite que possam ser realizadas colheitas em amostras degradadas, nas quais os miRNAs se encontram em quantidade e qualidade adequadas, alcançando, assim, resultados fiáveis e reproduzíveis em análises moleculares subsequentes.

O uso de miRNAs nas ciências forenses tem surgido como uma abordagem promissora devido às suas características e capacidade de fornecer informações complementares à análise de DNA. Estudos recentes destacam a aplicação de perfis de miRNAs na identificação de fluidos biológicos forenses, como sangue, saliva, sêmen, secreções vaginais, urina, fezes e secreções menstruais, e, para além disso, estas moléculas também têm sido exploradas na determinação do tempo de lesões existentes num cadáver, para perceber se se tratam de lesões *ante mortem* ou *post mortem* (65, 66). Adicionalmente, a elevada estabilidade dos miRNAs em vários biofluidos poderá ser uma característica promissora para que a análise destas moléculas seja aplicada no processo de estimativa do IPM, já que um dos grandes entraves que são encontrados é a existência de uma grande parte de amostras degradadas (22).

Efetivamente, já se verificam avanços relevantes na investigação da utilização de miRNAs para a determinação do IPM. Um exemplo é o estudo de Na e colaboradores, onde se analisaram amostras de tecido ósseo humano em diferentes períodos *post mortem* (entre 1 dia e 2 anos) e foi demonstrado que os níveis de expressão dos miRNAs let-7e e hsa-miR-16 apresentavam uma diminuição progressiva com o aumento do IPM, evidenciando que podem ser potenciais biomarcadores para o tecido ósseo (67). De igual modo, Ahmad e colaboradores avaliaram a expressão do hsa-miR-122 em amostras cardíacas de vítimas de intoxicação por fosfeto de alumínio, tendo encontrado uma correlação positiva entre os níveis deste miRNA e o tempo decorrido desde a morte, destacando a importância de avaliar se diferentes contextos podem afetar a expressão dos miRNAs, o que é crucial para confirmar a universalidade dos biomarcadores (68).

Deste modo, é pertinente a análise da expressão de miRNAs envolvidos na produção do cortisol e da aldosterona, podendo esta representar uma estratégia eficiente para a determinação do IPM. A regulação da produção de cortisol e de aldosterona envolve fatores pós-transcricionais, como é o caso dos miRNAs, que são capazes de modular a expressão de enzimas importantes nas vias de biossíntese destas hormonas (69).

Na literatura, temos encontrado diversos estudos que têm investigado o papel dos miRNAs na regulação da produção de hormonas, como o cortisol e a aldosterona (70-72).

Robertson e colaboradores demonstraram que o hsa-miR-24 regula negativamente a expressão das enzimas CYP11B1 e CYP11B2, fundamentais para a síntese de cortisol e aldosterona, respetivamente, mostrando que alterações nos níveis de miRNA podem afetar as vias de biossíntese hormonais (71).

Adicionalmente, o hsa-miR-10b foi identificado por Nusrin e colaboradores como um potencial inibidor da produção de cortisol e aldosterona, através da repressão dos genes codificadores das enzimas CYP11B1 e CYP11B2, à semelhança do que foi observado para o hsa-miR-24, mencionado acima (70).

Para além disso, encontramos ainda evidências num estudo de Peng e colaboradores de que o hsa-miR-203 mostrou uma diminuição significativa dos seus níveis de expressão em adenomas produtores de aldosterona, contribuindo para o aumento da secreção desta hormona (72).

Desta forma, ressalta-se a importância crescente em investigar os miRNAs como potenciais biomarcadores do ritmo circadiano, através da sua associação com as vias de secreção do cortisol e da aldosterona.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Principal

Estudo de um perfil de expressão de miRNAs associados às vias de síntese do cortisol e da aldosterona como biomarcadores do ritmo circadiano e potencial aplicação na estimativa do IPM.

2.2. Objetivos Específicos

- Revisão de literatura científica e definição do perfil de miRNAs envolvidos nas vias de biossíntese do cortisol e da aldosterona com potencial para serem utilizados como biomarcadores do ritmo circadiano;
- Determinação do perfil de expressão dos hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-424 e hsa-miR-643 em amostras de sangue e saliva numa população portuguesa de indivíduos saudáveis;
- Quantificação dos níveis de cortisol e de aldosterona na população em estudo;
- Associação do perfil de expressão dos miRNAs estudados e o ritmo circadiano, através dos níveis de cortisol e de aldosterona determinados.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e métodos

3.1. Seleção do perfil de miRNAs a analisar

Os miRNAs a analisar neste estudo foram selecionados através de revisão da literatura científica, com recurso às plataformas online Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) e Google Scholar (<https://scholar.google.com>). Primeiramente, foi feita uma pesquisa tendo em conta as seguintes palavras-chave: “miRNAs in circadian rhythm”; “miRNAs in cortisol regulation”; “Aldosterone regulation by miRNAs”; “miRNAs in forensic science”. Para definição do perfil de miRNAs que seriam alvo de estudo, foram selecionados aqueles que tinham informações relativas à sua influência na regulação de pelo menos uma das enzimas que participa nas vias de biossíntese do cortisol e da aldosterona. Após análise da literatura científica foram selecionados 5 miRNAs para serem analisados na população em estudo: hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-424 e hsa-miR-643.

3.2. População em estudo

A população em estudo foi constituída por 20 indivíduos saudáveis provenientes de uma coorte em estudo, cujas amostras biológicas foram colhidas e processadas mediante consentimento informado, garantindo o cumprimento das normas éticas e legais. Com o objetivo de estudar a expressão de miRNAs associados ao ritmo circadiano, procedeu-se à recolha de sangue periférico em dois momentos distintos do dia: a primeira colheita foi realizada ao início da manhã (cerca das 8 horas) e a segunda ao início da tarde (cerca das 15 horas). Adicionalmente, foram obtidas amostras de saliva dos mesmos participantes no período noturno (cerca das 24 horas), com recurso a um kit salivette (Figura 6).

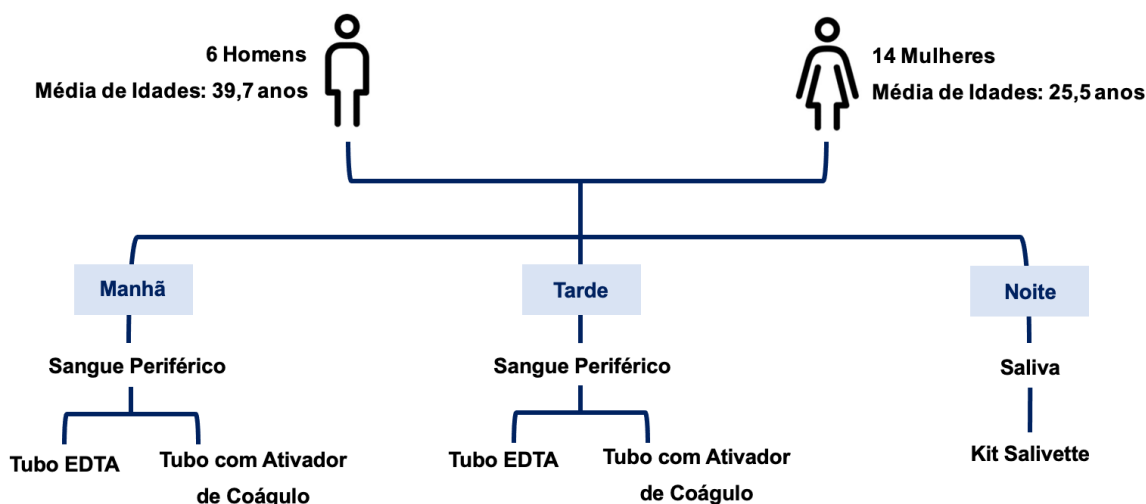


Figura 6: Colheita das amostras biológicas.

3.3. Processamento das amostras

Após a colheita, as amostras salivares foram centrifugadas durante 2 minutos a 1000g e o sobrenadante foi posteriormente transferido para um tubo *ependorf*.

Já as amostras de sangue periférico foram primeiramente centrifugadas a 2500 rpm, durante 5 minutos. Após esta primeira centrifugação, a amostra foi dividida em 3 tubos *ependorf*: para o primeiro tubo, foi transferido 1 mL de plasma, no segundo *ependorf* colocou-se 1 mL de sangue total e, para o último tubo transferiram-se 200 µL de sangue para extração de miRNAs. Depois de devidamente identificados, todos os *ependorf* foram armazenados a -20°C. O restante sangue foi transferido para um tubo cônico, onde se adicionou cloreto de amônio (NH₄Cl), fosfato de hidrogénio e EDTA (AKE 1X), para se dar a lise dos eritrócitos. Estas amostras foram refrigeradas por 20 minutos e centrifugadas nas seguintes condições: 2500 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de leucócitos resultante sofreu um processo de ressuspensão em diferentes soluções, seguido de centrifugação nas condições anteriormente descritas. A primeira ressuspensão foi em AKE 1X, a seguinte em PBS 1X, para lavagem celular e, por último, o *pellet* ficou ressuspendido em *TripleExtractor (Grisp-Research Solutions®)*. Após esta última ressuspensão, a solução com o *pellet* de leucócitos foi armazenada a -80°C.

3.4. Extração de miRNA

A extração de miRNAs das amostras de saliva foi realizada com recurso ao *GRS microRNA Purification kit (Grisp Research Solutions®)*, enquanto que, para as amostras de sangue periférico, se recorreu ao *MagMax™ mirVana™ Total RNA Isolation kit (Applied Biosystems®)*. Ambos os métodos de extração apresentam vantagens consideráveis, nomeadamente pela rapidez e eficiência do protocolo, sendo especialmente adequados para amostras com baixa concentração de RNA, devido à sua elevada sensibilidade. Em particular, o *MagMax™ mirVana™ Total RNA Isolation kit (Applied Biosystems®)* beneficia de uma tecnologia baseada em partículas magnéticas, que promove uma extração reprodutível e consistente, minimizando variações técnicas e aumentando a fiabilidade dos resultados. Foram seguidos os procedimentos recomendados pelos fabricantes, com algumas adaptações laboratoriais.

Após a extração, avaliou-se a integridade e a qualidade do RNA nas amostras através da utilização do *Nanodrop™ Lite (Thermo Scientific®)*.

3.5. Síntese de cDNA

Após a quantificação, procedeu-se à síntese do DNA complementar (cDNA) de interesse. A síntese de cDNA dos miRNAs hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-424 e hsa-miR-643 e ainda do controlo endógeno RNU48 foi realizada com recurso ao kit *TaqMan™ microRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems®). Como reagentes foram utilizados 10X RT Buffer, mix de dNTPs (desoxiribonucleótidos trifosfato) com dTTP, inibidor de RNase, enzima MultiScribe RT, água, *primers* específicos para cada um dos miRNAs e para o controlo endógeno selecionados e 10 µL de RNA de cada uma das amostras, sendo usadas as seguintes condições de amplificação: 16°C por 30 minutos, seguido de 60 minutos a 42°C, terminando com 85°C durante 10 minutos.

3.6. Quantificação por PCR em tempo real

A quantificação da expressão do perfil de miRNAs em estudo foi realizada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Esta é uma técnica amplamente utilizada devido à sua rapidez, elevada sensibilidade e capacidade de gerar dados precisos e reprodutíveis. Esta metodologia combina a amplificação tradicional de PCR com a quantificação da fluorescência produzida em cada ciclo de amplificação, permitindo, assim, acompanhar a reação em tempo real, ciclo a ciclo. Um dos parâmetros chave nesta técnica é o Ct (*cycle threshold*), que corresponde ao número de ciclos necessário para que a fluorescência ultrapasse um limiar definido, refletindo o momento em que o produto amplificado se torna detetável. É importante referir que o valor de Ct é inversamente proporcional à quantidade de miRNA presente na amostra.

As reações foram realizadas no aparelho StepOne™ *qPCR Real-Time*. A mistura de reação envolveu os seguintes reagentes: H₂O, 1X *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems®) e 1X sondas específicas para amplificar os miRNAs alvo e o controlo endógeno RNU48 (*TaqMan microRNA Expression Assays®*, hsa-miR-125a-5p (TM: 002198, Applied Biosystems®), hsa-miR-125b-5p (TM: 000449, Applied Biosystems®), hsa-miR-193a-3p (TM: 002250, Applied Biosystems®), hsa-miR-424 (TM: 000604, Applied Biosystems®), hsa-miR-643 (TM: 001594, Applied Biosystems®) e RNU48 (TM: 001006, Applied Biosystems®)), juntamente com o cDNA de cada amostra (3 µL por amostra). Todas as quantificações foram realizadas em duplicado, tendo sido incluído um controlo negativo com o objetivo de detetar eventuais contaminações em cada placa de reação.

Um exemplo de curva de amplificação obtida durante o qPCR é apresentada abaixo, onde é possível visualizar a dinâmica do sinal de fluorescência durante a reação (Figura 7).

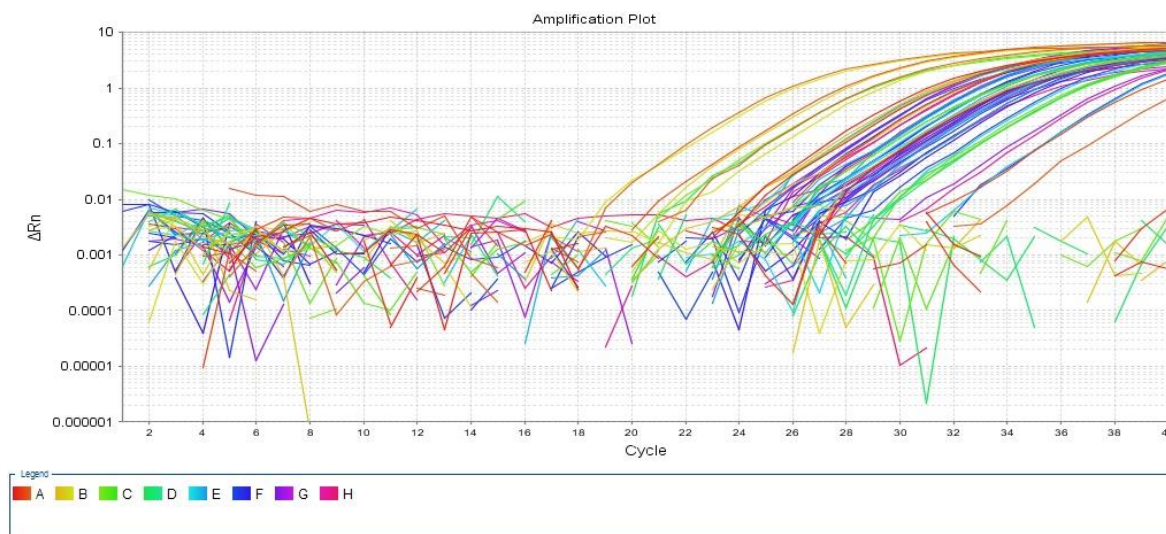


Figura 7: Curva de amplificação obtida no StepOne™ qPCR Real-Time.

3.7. Quantificação dos níveis de cortisol e aldosterona

A quantificação dos níveis de cortisol nas amostras de sangue e saliva, bem como dos níveis de aldosterona nas amostras sanguíneas, foi realizada em colaboração com o Serviço de Química Clínica do Departamento de Diagnóstico Laboratorial do IPO Porto, seguindo os respetivos procedimentos de rotina. A quantificação de cortisol foi efetuada através do teste *ElecsysCortisol II*® (Cobas®), ao passo que a de aldosterona foi realizada com recurso ao teste *LIAISON*® Aldosterone (DiaSorin). A medição dos níveis de aldosterona nas amostras de saliva colhidas no período noturno não foi realizada, devido ao facto de não se dispor de volume suficiente de amostra para a análise.

3.8. Análise Estatística

A análise das curvas de amplificação foi realizada através do StepOne™ (Applied Biosystems®), utilizando a mesma linha de base e o mesmo limite definidos para cada placa, de modo a obter os valores de Ct para todos os miRNAs presentes nas amostras.

Para a quantificação do nível de expressão de cada miRNA, foram utilizados os valores de Ct para obter valores de ΔCt , de acordo a seguinte fórmula:

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

Seguidamente, com vista a analisar a diferença entre a expressão dos diferentes miRNAs, foi calculado o fold-change, seguindo o Método de *Livak* e *Schmittgen* (73):

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

Por último, a análise estatística foi realizada com recurso ao software *IBM®SPSS®Statistics* (version 30.0).

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Frequência de detecção dos miRNAs alvo nas amostras biológicas

Nas amostras estudadas, verificou-se que todos os miRNAs que constituem o perfil selecionado foram detetados em ambos os fluídos biológicos analisados (sangue periférico e saliva), com frequências de detecção altas, sempre iguais ou superiores a 65%.

No período da manhã, todos os miRNAs analisados foram identificados nas amostras sanguíneas e apresentaram frequências de detecção elevadas, iguais ou superiores a 85% (Figura 8a). O hsa-miR-125a-5p destacou-se por apresentar uma frequência de detecção de 95%, enquanto que o hsa-miR-125b-5p e o hsa-miR-424 apresentaram as frequências mais baixas, de 85%.

Nas amostras colhidas no período da tarde, observou-se uma diminuição generalizada da frequência de detecção dos miRNAs nas amostras sanguíneas, em comparação com os valores observados nas amostras colhidas de manhã. O hsa-miR-125a-5p manteve-se como o miRNA com maior frequência de detecção (85%), sendo que os hsa-miR-125b-5p e hsa-miR-424 foram os miRNAs com menor frequência de detecção (70%), à semelhança do ocorrido na análise das amostras correspondentes ao período da manhã (Figura 8b).

Durante o intervalo noturno, três dos miRNAs selecionados, o hsa-miR-125a-5p, o hsa-miR-125b-5p e o hsa-miR-193a-3p, foram detetados em todas as amostras de saliva analisadas. Contrariamente, o hsa-miR-643 registou a frequência de detecção mais baixa neste período, tendo sido detetado somente em 65% das amostras incluídas no estudo (Figura 8c).

Globalmente, de acordo com os resultados, é possível observar que o hsa-miR-125a-5p é o miRNA mais frequente em todas as amostras analisadas, apresentando a frequência de detecção mais elevada em todos os períodos do dia, ao passo que o hsa-miR-643 registou a frequência média mais baixa, assumindo-se como o menos frequente de entre os miRNAs estudados.

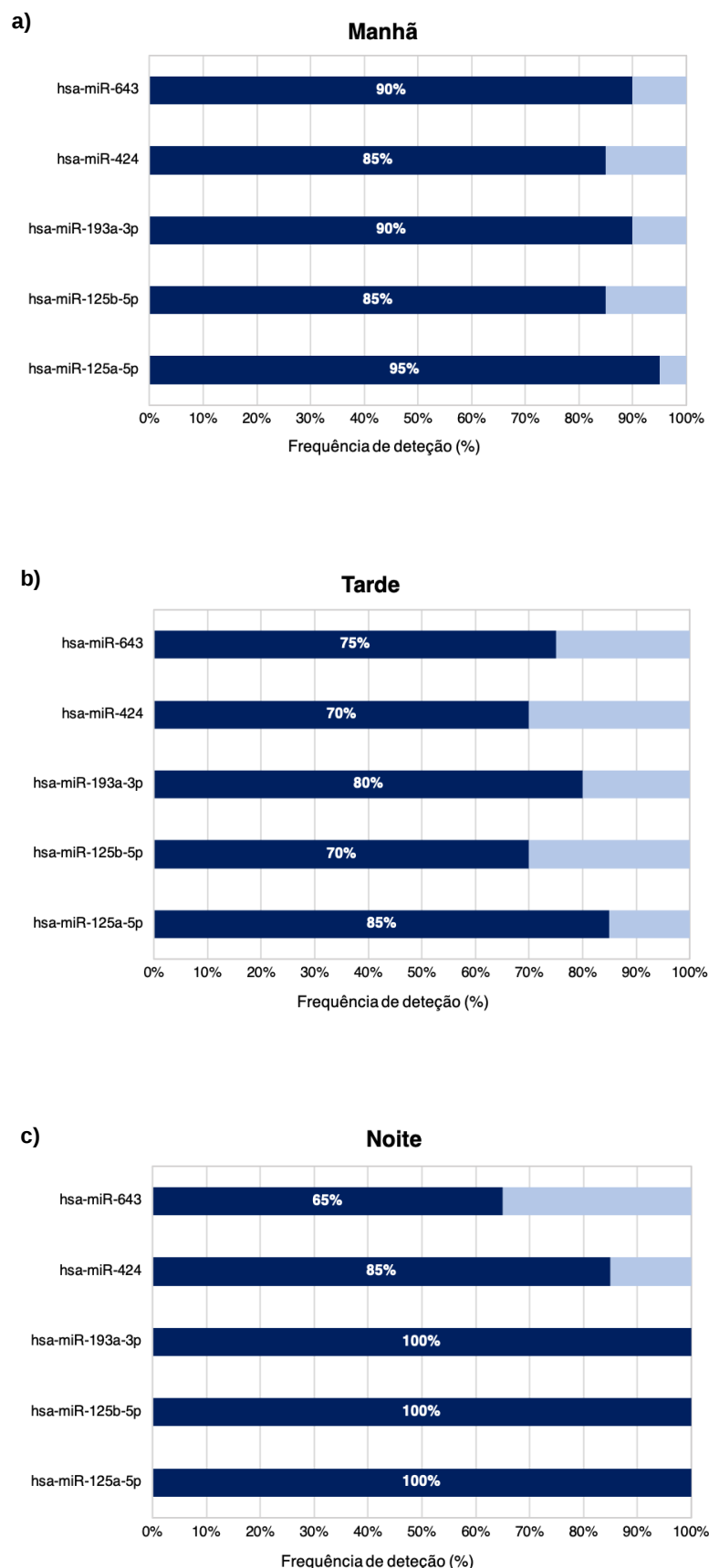


Figura 8: Frequência de detecção dos miRNAs alvo de estudo nas amostras de sangue, correspondentes aos períodos da manhã (a) e da tarde (b), e nas amostras de saliva, relativas ao período noturno (c).

4.2. Quantificação relativa da expressão do perfil de miRNAs ao longo do período de 24 horas

De maneira a ser possível avaliar a associação da expressão do perfil de miRNAs em estudo e o ritmo circadiano, foi analisada a expressão relativa destes nas amostras biológicas colhidas nos diferentes períodos temporais diários (manhã, tarde, noite) (Figura 9).

No caso do hsa-miR-125a-5p, observa-se uma ligeira diminuição dos níveis deste miRNA entre os períodos da manhã e da tarde ($P = 0,663$), seguida de um aumento estatisticamente significativo entre a tarde e a noite ($P < 0,001$) (Figura 9a). Uma dinâmica semelhante é observada no hsa-miR-424, cuja variação circadiana se encontra representada na Figura 9d.

Quanto ao hsa-miR-125b-5p, observa-se uma tendência de aumento ao longo do dia, com uma subida ténue dos níveis deste miRNA entre os períodos da manhã e da tarde, embora não estatisticamente significativa ($P = 0,992$). Contudo, observa-se um aumento estatisticamente significativo dos níveis do hsa-miR-125b-5p no período da noite ($P < 0,001$) (Figura 9b). Um comportamento análogo é identificado no hsa-miR-193a-3p, cujo aumento mais pronunciado da expressão ocorre na transição entre os períodos da tarde e da noite ($P < 0,001$) (Figura 9c).

Por sua vez, o hsa-miR-643 apresenta um aumento mais progressivo ao longo do dia, sem variações tão acentuadas, embora se destaque uma subida ligeiramente mais pronunciada e com significado estatístico entre os períodos da tarde e da noite ($P < 0,001$) (Figura 9e).

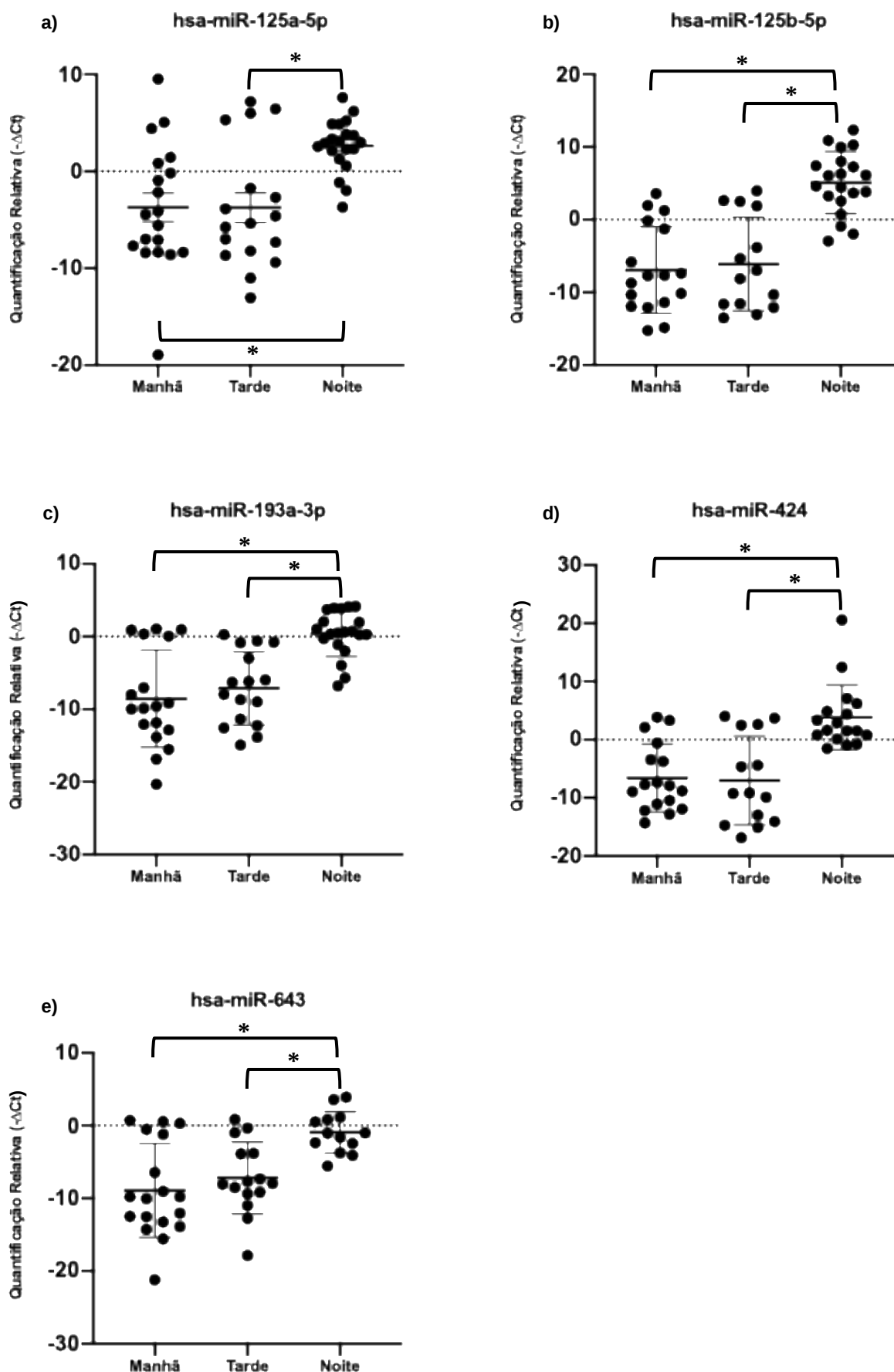


Figura 9: Quantificação relativa (-ΔCt) dos miRNAs alvo de estudo nos 3 períodos do dia nas amostras de sangue periférico e saliva. * $P < 0,050$.

4.3. Associação dos níveis de cortisol e aldosterona e os níveis de expressão do perfil de miRNAs ao longo do dia

Em simultâneo com o estudo da variação diária dos níveis de expressão dos miRNAs, foram determinadas as concentrações de cortisol e aldosterona ao longo do dia.

Relativamente à análise dos níveis de cortisol, os dados demonstraram uma variação acentuada, com concentrações máximas durante a manhã e mínimas no período noturno. O valor médio no intervalo da manhã foi de 26,12 µg/dL, reduzindo para uma concentração média de 14,03 µg/dL no período da tarde. À noite, quando se atingiu a concentração mínima desta hormona, o valor médio observado foi de 0,17 µg/dL.

No caso da aldosterona, foi possível observar uma diminuição dos níveis hormonais entre os dois momentos do dia, onde se verificou uma concentração média mais elevada no período da manhã (21,28 µg/dL), com um decréscimo para um valor médio de 12,36 µg/dL no período da tarde.

Ao analisar os níveis de expressão do hsa-miR-125a-5p ao longo do dia, observou-se que, entre a manhã e a tarde, a sua variação acompanhou a do cortisol e da aldosterona, embora a diminuição seja menos acentuada. No entanto, no intervalo entre a tarde e a noite, verificou-se uma inversão deste padrão: enquanto os níveis hormonais continuaram a diminuir, o hsa-miR-125a-5p apresentou um aumento significativo (Figura 10a e 10b).

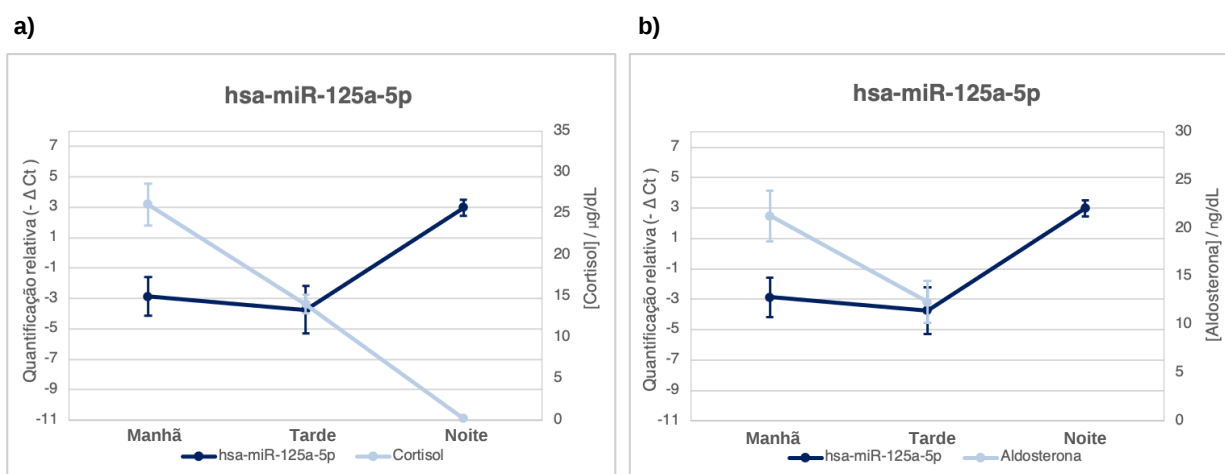


Figura 10: Comparação entre os níveis de hsa-miR-125a-5p e os níveis de cortisol (a) e de aldosterona (b) ao longo do dia.

Embora se observe uma diminuição dos níveis do hsa-miR-125a-5p entre a manhã e a tarde, esta não é estatisticamente significativa ($P = 0,663$). Contudo, quando se comparam

os níveis deste miRNA de manhã com os observados à noite, observa-se um aumento estatisticamente significativo de 57,68 vezes ($P < 0,001$). Este aumento de expressão ainda é mais pronunciado quando se comparam os níveis registados nas amostras colhidas no período da tarde com os da noite, verificando-se um aumento de 106,15 vezes do hsa-miR-125a-5p nas amostras de saliva colhidas no período da noite ($P < 0,001$) (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de fold-change e P-value para o hsa-miR-125a-5p.

	Manhã vs Tarde	Manhã vs Noite	Tarde vs Noite
Fold-change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	0,54	57,68	106,15
P	0,663	< 0,001	< 0,001

Relativamente ao hsa-miR-125b-5p, e contrariamente ao observado para o miRNA supramencionado, verificou-se uma evolução oposta à variação do cortisol e da aldosterona ao longo do dia. Enquanto que os níveis hormonais apresentaram uma diminuição contínua, a expressão do hsa-miR-125b-5p seguiu o padrão inverso, onde teve um aumento pouco relevante entre os dois primeiros períodos do dia e evoluiu de forma acentuada no intervalo entre a tarde e a noite (Figura 11a e 11b).

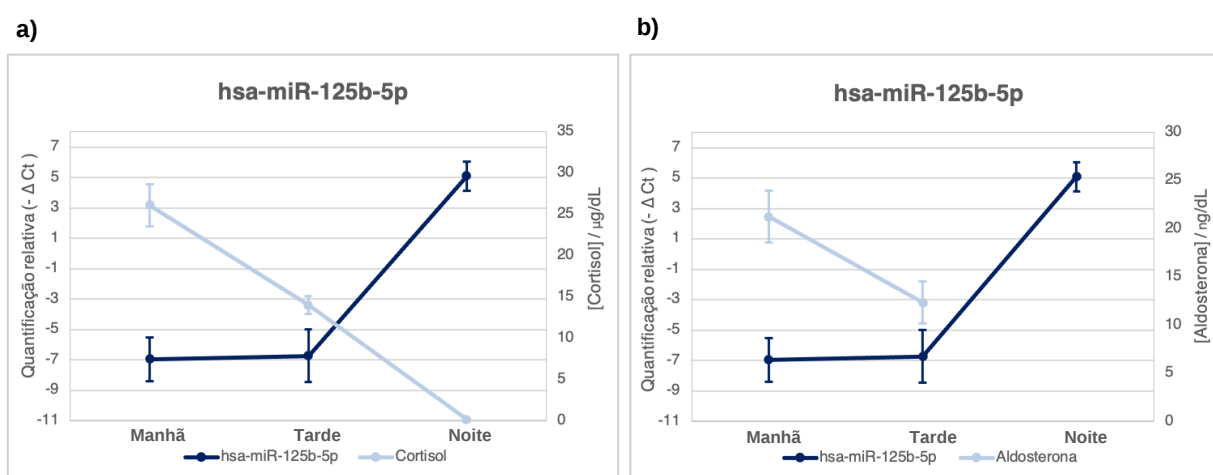


Figura 11: Comparação entre os níveis de hsa-miR-125b-5p e os níveis de cortisol (a) e de aldosterona (b) ao longo do dia.

A análise dos dados evidenciou um aumento dos níveis de hsa-miR-125b-5p entre os dois primeiros períodos do dia, o qual não se mostrou estatisticamente significativo ($P = 0,992$). Por outro lado, verificou-se um aumento de 4182,07 vezes entre os períodos da

manhã e da noite, variação esta que já se mostrou estatisticamente significativa ($P < 0,001$), tendência essa que se manteve na comparação entre a tarde e a noite, com um acréscimo de 3590,58 vezes ($P < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de fold-change e P-value para o hsa-miR-125b-5p.

	Manhã vs Tarde	Manhã vs Noite	Tarde vs Noite
Fold-change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	1,16	4182,07	3590,58
P	0,992	< 0,001	< 0,001

No que diz respeito ao hsa-miR-193a-3p, verificou-se uma evolução diária contrária àquela que foi observada para o cortisol e para a aldosterona, sendo possível notar um crescimento dos níveis de expressão do miRNA ao longo do dia, com um aumento mais pronunciado entre os períodos da tarde e da noite (Figura 12a e 12b).

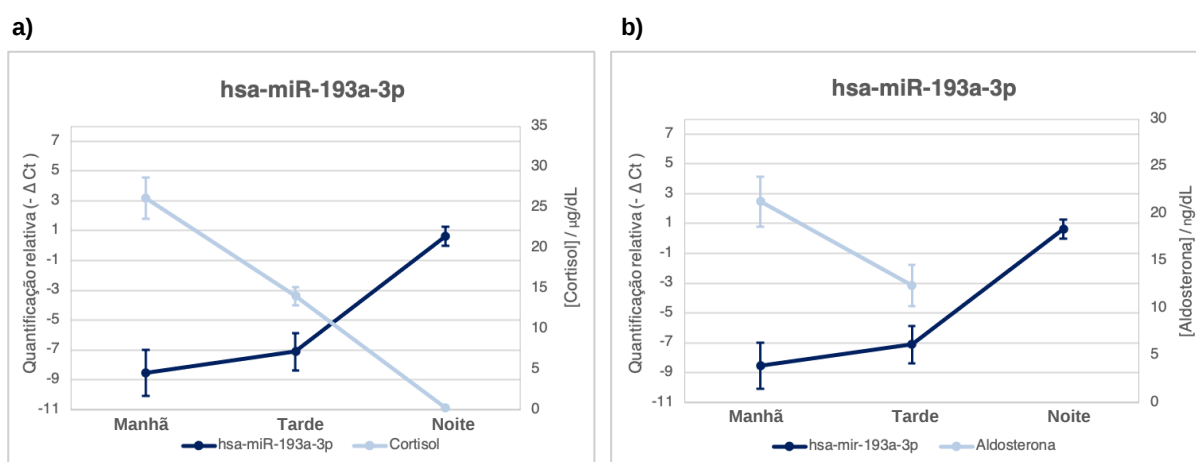


Figura 12: Comparação entre os níveis de hsa-miR-193a-3p e os níveis de cortisol (a) e de aldosterona (b) ao longo do dia.

O aumento de 2,68 vezes entre os níveis de expressão do hsa-miR-193a-3p observados no intervalo entre a manhã e a tarde não é estatisticamente significativo ($P = 0,496$), ao contrário do que se verifica nos restantes momentos do dia. Na comparação entre os níveis de miRNA da manhã e da noite, observa-se um aumento de 625,99 vezes ($P < 0,001$), aumento este que também se verifica para os valores dos períodos da tarde e da noite, apesar de menos acentuado, sendo este de 233,94 vezes ($P < 0,001$) (Tabela 3).

Tabela 3: Valores de fold-change e P-value para o hsa-miR-193a-3p.

	Manhã vs Tarde	Manhã vs Noite	Tarde vs Noite
Fold-change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	2,68	625,99	233,94
P	0,496	< 0,001	< 0,001

Relativamente ao hsa-miR-424, verificou-se que, entre a manhã e tarde, a sua expressão acompanhou a evolução dos níveis de cortisol e de aldosterona, apesar de a diminuição registada ser mais ligeira. Contudo, no intervalo entre a tarde e a noite, este padrão altera-se, com o miRNA a apresentar um aumento mais pronunciado, enquanto que os níveis hormonais mantêm a tendência de redução (Figura 13a e 13b).

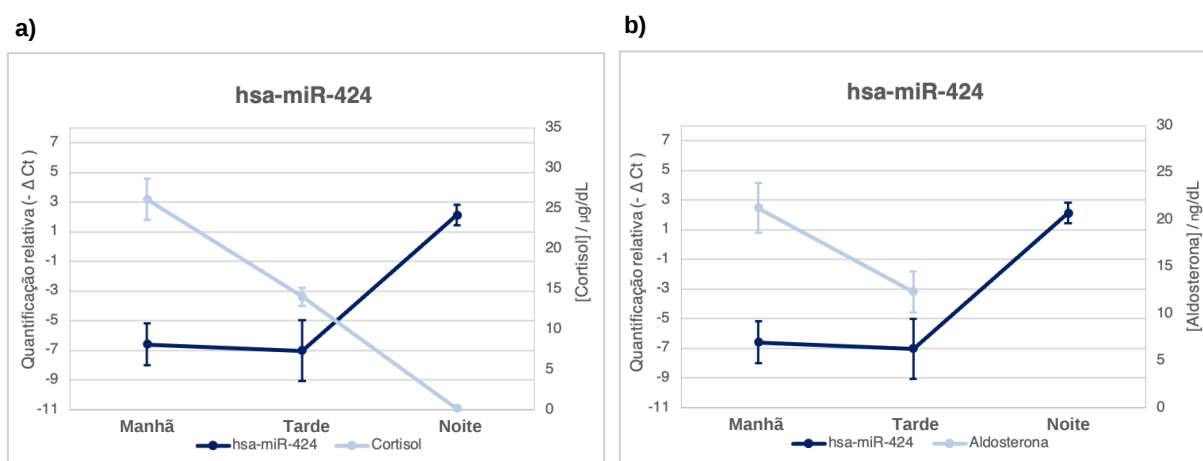


Figura 13: Comparação entre os níveis de hsa-miR-424 e os níveis de cortisol (a) e de aldosterona (b) ao longo do dia.

A diminuição dos níveis de hsa-miR-424 verificada entre os períodos da manhã e da tarde não é estatisticamente significativa ($P = 0,860$), ao contrário do que se observa nas restantes comparações entre períodos do dia. A análise entre os valores obtidos nos períodos da manhã e da noite revelou um aumento de 421,68 vezes, com significado estatístico ($P < 0,001$), diferença que se mostrou ainda mais evidente na comparação entre os níveis da tarde e da noite, onde existiu um aumento de 568,10 vezes ($P < 0,001$) (Tabela 4).

Tabela 4: Valores de fold-change e P-value para o hsa-miR-424.

	Manhã vs Tarde	Manhã vs Noite	Tarde vs Noite
Fold-change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	0,74	421,68	568,10
P	0,860	< 0,001	< 0,001

Quanto ao hsa-miR-643, observou-se um aumento da expressão ao longo do dia, evolução esta que é inversa à dos níveis de cortisol e de aldosterona. Apesar de o aumento da expressão ser mais uniforme neste caso, verifica-se, ainda assim, um aumento mais acentuado na segunda parte do dia, entre os períodos da tarde e da noite (Figura 14a e 14b).

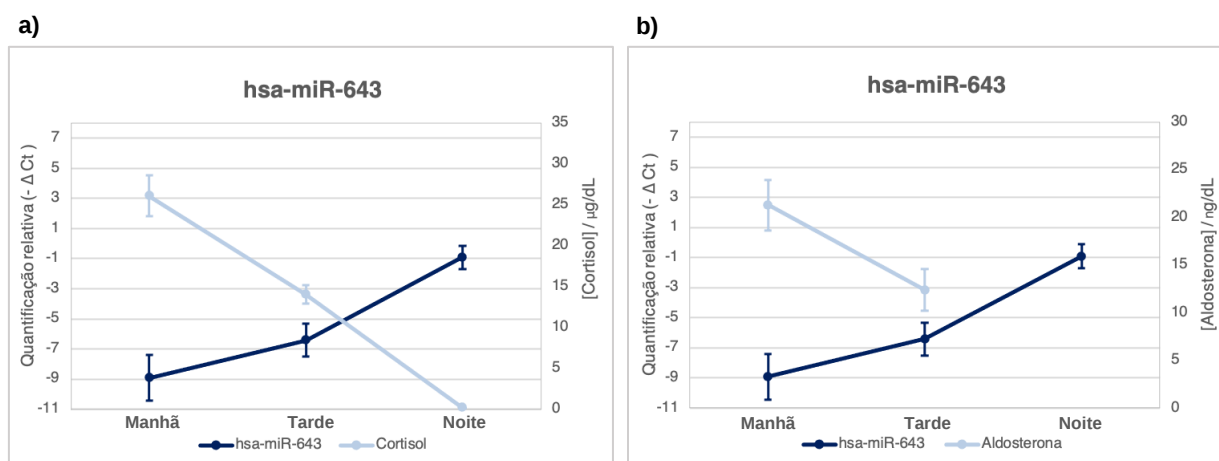


Figura 14: Comparação entre os níveis de hsa-miR-643 e os níveis de cortisol (a) e de aldosterona (b) ao longo do dia.

Apesar de o aumento verificado entre a manhã e a tarde ser mais acentuado que nos casos anteriores, não se mostra estatisticamente significativo ($P = 0,219$). Em contrapartida, ao comparar os níveis de hsa-miR-643 medidos na manhã com os registados à noite, verificamos um aumento com significado estatístico de 256,00 vezes ($P < 0,001$), que se mantém na comparação entre o período da tarde e da noite, apesar de menos marcado, com um acréscimo de 45,47 vezes ($P < 0,001$) (Tabela 5).

Tabela 5: Valores de fold-change e P-value para o hsa-miR-643.

	Manhã vs Tarde	Manhã vs Noite	Tarde vs Noite
Fold-change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	5,62	256,00	45,47
<i>P</i>	0,219	< 0,001	< 0,001

DISCUSSÃO

5. Discussão

A determinação do IPM, definido como o tempo decorrido entre a morte de um indivíduo e a descoberta do respetivo cadáver, é fundamental na prática forense, uma vez que fornece informações essenciais à prática judicial, nomeadamente a nível da reconstrução cronológica dos acontecimentos e da análise da credibilidade de álibis. Contudo, apesar da sua relevância, o cálculo do IPM constitui um dos maiores desafios na Medicina Legal, dado que os métodos atualmente disponíveis apresentam limitações significativas e estão muito dependentes da variabilidade interindividual, o que pode comprometer a fiabilidade dos resultados. Esta incerteza evidencia a necessidade de desenvolver novas abordagens que permitam que o cálculo do IPM seja mais rigoroso, robusto e consistente. Os miRNAs surgem como ferramentas promissoras neste contexto, devido a várias características intrínsecas, nomeadamente o facto de serem moléculas com elevada estabilidade, que lhes oferece uma resistência significativa à degradação enzimática e às condições adversas que ocorrem no período *post mortem*, que são fatores altamente limitantes e que têm dificultado a implementação de novos biomarcadores nesta área. Para além disso, a expressão dos miRNAs é modulada por determinados processos fisiológicos e metabólicos que ocorrem diariamente, como a regulação hormonal, o que torna particularmente interessante a hipótese de explorar a relação destas moléculas com as vias de biossíntese de hormonas, como o cortisol e a aldosterona, cuja variação circadiana pode acrescentar valor à estimativa do IPM. Assim, o estudo de miRNAs envolvidos na regulação circadiana destas moléculas poderá fornecer informações temporais mais precisas e robustas, permitindo uma melhor associação a determinados acontecimentos ou eventos que ocorreram no momento da morte de um indivíduo.

A seleção dos miRNAs hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-424 e hsa-miR-643 revela-se particularmente pertinente no estudo do ritmo circadiano associado às vias de biossíntese do cortisol e da aldosterona, dado que estes pequenos reguladores pós-transcricionais têm sido implicados na regulação de processos moleculares determinantes para a síntese hormonal e para a adaptação funcional a oscilações circadianas. Estudos recentes demonstram que vários miRNAs exibem padrões de expressão rítmicos, interagindo com componentes do relógio biológico e influenciando a atividade de enzimas chave do metabolismo hormonal (69, 74). No presente estudo, verificou-se uma dinâmica marcada por variações inversas entre a expressão dos miRNAs e os níveis de cortisol e de aldosterona, o que sugere a existência de mecanismos de regulação por feedback, que contribuem para a regulação circadiana da síntese hormonal.

Além do interesse biológico destes miRNAs, a sua detecção em elevada frequência em amostras de sangue e saliva evidencia a relevância de ambos os fluídos biológicos num contexto de investigação forense. Esta elevada taxa de detecção, que se verifica também nos resultados do nosso estudo, é essencial para a aplicação em contextos forenses, uma vez que torna possível utilizar os padrões de expressão destes miRNAs na estimativa do IPM.

A análise dos perfis de expressão dos diferentes miRNAs selecionados revelou dinâmicas distintas ao longo do dia, mas com um padrão de variação comum entre os períodos da tarde e da noite. O hsa-miR-125a-5p e o hsa-miR-424 apresentaram um comportamento semelhante, caracterizado por uma ligeira diminuição entre a manhã e a tarde, seguida de um aumento expressivo para o período noturno. Pelo contrário, no caso do hsa-miR-193a-3p e do hsa-miR-643, revelou-se uma tendência de aumento progressivo ao longo de todo o dia, embora este aumento tenha sido mais pronunciado no intervalo entre a tarde e a noite. Já o miR-125b-5p manteve os níveis de expressão relativamente estáveis entre a manhã e a tarde, apesar de se verificar um ligeiro aumento da expressão, mas, à semelhança do observado nos restantes casos, verificou-se um aumento acentuado dos níveis de expressão no período noturno. É importante salientar que o comportamento que foi verificado para todos os miRNAs no intervalo entre a tarde e a noite foi inverso ao observado no cortisol e na aldosterona, que apresentaram um declínio nos níveis quantificados.

Robertson e colaboradores desenvolveram um estudo onde conseguiram observar que o hsa-miR-125a-5p e o hsa-miR-125b-5p desempenham um papel central na regulação da biossíntese do cortisol e da aldosterona, atuando como reguladores negativos das enzimas que participam nestas vias (69). Neste trabalho recorreu-se ao ensaio da luciferase, uma técnica que consiste em ligar a região 3'UTR do mRNA de interesse ao gene da enzima; quando um miRNA se liga a essa região, a produção de luminescência pela luciferase diminui, mostrando uma maior repressão do gene alvo (75). Assim, verificou-se que a sobreexpressão destes miRNAs estava associada a uma diminuição da atividade da luciferase ligada à região 3'UTR do mRNA da CYP11B2, traduzindo-se numa inibição da síntese da enzima correspondente. Consequentemente, a produção de aldosterona ficou comprometida, uma vez que a enzima responsável pelas etapas finais da biossíntese estava suprimida (69). Estes resultados são corroborados pelo estudo de Wood e colaboradores, onde se evidenciou que o aumento de expressão do hsa-miR-125a-5p e do hsa-miR-125b-5p reduz a atividade do gene da luciferase ligada à região 3'UTR da CYP11B2, confirmando o seu papel como reguladores negativos desta enzima (76). Por

outro lado, a redução da expressão de Dicer, enzima essencial para a biogénese de miRNAs, provocou um aumento nos níveis do mRNA das enzimas CYP11B1, CYP11B2, CYP11A1, CYP17 e CYP21, todas elas envolvidas ativamente nas etapas de produção do cortisol e da aldosterona. Este aumento foi então acompanhado por uma elevação dos níveis hormonais, evidenciando o efeito regulador negativo dos miRNAs na biossíntese hormonal (69). Para além destes mecanismos diretos, estudos adicionais mostraram que o hsa-miR-125a-5p também atua na regulação negativa da HMGCR (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase), enzima que controla o passo principal da via do mevalonato, fundamental para a produção de colesterol (77). Como o colesterol é o substrato inicial da biossíntese de cortisol e de aldosterona, este achado sugere que o hsa-miR-125a-5p não atua apenas nas fases finais da síntese das hormonas, mas pode também influenciar de forma indireta a disponibilidade de colesterol e, consequentemente, a produção de cortisol e de aldosterona. Na presente investigação, tanto o hsa-miR-125a-5p e o hsa-miR-125b-5p mostraram um aumento acentuado nos níveis de expressão no período noturno, em contraste com a variação verificada para o cortisol e aquela que seria expectável de acontecer no caso da aldosterona, que diminuíram os níveis nesse mesmo intervalo. Estes resultados estão em concordância com os dados da literatura, sugerindo que o hsa-miR-125a-5p e o hsa-miR-125b-5p funcionam como reguladores negativos das vias de biossíntese do cortisol e da aldosterona e podem ser considerados como potenciais biomarcadores do ritmo circadiano.

Quanto ao miR-193a-3p, Zhang e colaboradores identificaram este miRNA como sendo um regulador negativo da biossíntese de aldosterona, atuando diretamente sobre a enzima CYP11B2 no tecido adrenal humano. Nesse mesmo estudo, verificou-se que um aumento na expressão do miR-193a-3p reduzia a atividade da luciferase ligada ao 3'UTR da CYP11B2, levando, consequentemente, a uma queda na produção de aldosterona (78). Além disso, os autores observaram que a expressão do hsa-miR-193a-3p estava significativamente reduzida em adenomas produtores de aldosterona (APA), em comparação com o tecido adrenal normal adjacente. Esta diminuição sugere que a perda da ação reguladora do miRNA sobre a CYP11B2 pode contribuir para o aumento da síntese de aldosterona observado nos APA (78). No nosso estudo, observou-se um aumento da expressão deste miRNA ao longo do dia, principalmente entre os períodos da tarde e da noite. Este comportamento é coerente com a queda progressiva da aldosterona que era expectável acontecer no decorrer do dia, sendo possível colocar a hipótese de que o aumento do hsa-miR-193a-3p contribui para a inibição da síntese desta hormona. É possível assim considerar que este miRNA é um potencial biomarcador do ritmo circadiano para o estudo do IPM.

No que diz respeito ao hsa-miR-424, na literatura ainda não foi encontrada uma relação direta entre este miRNA e a biossíntese de hormonas em tecido adrenal humano. No entanto, existem algumas evidências que sugerem que o hsa-miR-424 pode ter um papel relevante na regulação do cortisol e da aldosterona. Um estudo realizado em células estromais endometriais mostra que o hsa-miR-424 atua como regulador negativo do gene *wnt4* (79). Este gene tem vindo a ser associado à ativação da expressão de enzimas como a CYP17A1 e a CYP21, fundamentais na produção de cortisol e de aldosterona, funcionando como um regulador positivo das mesmas (80). Neste sentido, colocamos a hipótese de que o aumento dos níveis de expressão do hsa-miR-424, que verificamos no presente estudo entre os períodos da tarde e da noite, exerce um efeito inibitório na biossíntese do cortisol e da aldosterona, graças à redução da expressão das enzimas participantes nesses processos. Apesar disso, é importante salientar que esta é uma hipótese que necessita de validação experimental em tecidos adrenocorticais humanos. Ainda assim, a comparação entre o perfil de expressão do hsa-miR-424 observado neste estudo e o papel descrito na literatura do *wnt4* na biossíntese hormonal permite sugerir este miRNA como um potencial biomarcador útil para a estimativa do IPM.

Quanto ao hsa-miR-643, um estudo em carcinoma papilar da tireoide demonstrou que este miRNA atua como regulador negativo da CYP11B1, enzima responsável pela etapa final da biossíntese de cortisol (81). Graças a esta associação, uma sobreexpressão de hsa-miR-643 resultou numa diminuição da tradução da enzima CYP11B1 (81). Apesar de estes resultados terem sido obtidos fora de um contexto adrenal, é plausível que o hsa-miR-643 participe também na regulação da síntese de cortisol em condições fisiológicas, gerando uma diminuição da produção hormonal. Para além da interação direta com a CYP11B1, o hsa-miR-643 pode também influenciar a produção de cortisol de forma indireta, através da regulação do *TRAF6* (*Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6*), um mediador central da sinalização inflamatória que ativa o fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear kappa B). A ativação de NF- κ B promove a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 (interleucina 6) e TNF- α (*Transactivation-responsive RNA-Binding Protein*), que estimulam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e, consequentemente, a secreção de cortisol (82). Estudos demonstraram que o miR-643 inibe a expressão de *TRAF6*, reduzindo a ativação de NF- κ B e a produção de citocinas, o que sugere uma diminuição indireta da estimulação do eixo HPA e da libertação de cortisol (83, 84). Assim, para além da ação direta sobre a biossíntese hormonal, o hsa-miR-643 poderá modular a produção de cortisol através da regulação de vias inflamatórias, reforçando o seu potencial papel como regulador do ritmo circadiano hormonal. Esta hipótese torna-se particularmente relevante e compatível com os resultados obtidos no

presente trabalho, onde se verificou um aumento acentuado dos níveis de expressão do hsa-miR-643 ao longo de todo o dia, em oposição à variação decrescente de cortisol, o que torna plausível afirmar que o hsa-miR-643 é um potencial biomarcador do ritmo circadiano.

Assim, tendo em conta os resultados obtidos e as evidências científicas, podemos afirmar que todos os miRNAs que foram selecionados para este estudo podem ser considerados potenciais biomarcadores do ritmo circadiano para a estimativa do IPM, nomeadamente, nos períodos da tarde e da noite, onde se observou um aumento significativo da expressão de todos os miRNAs, contrastante com a evolução dos níveis de cortisol e de aldosterona. Importa ainda reconhecer que a recolha de amostras foi realizada em diferentes fluidos biológicos ao longo do dia (sangue de manhã e à tarde e saliva à noite). Esta abordagem, embora necessária por razões práticas, constitui uma limitação relevante, uma vez que os níveis de expressão dos miRNAs podem variar com a matriz biológica em que são analisados. Ainda assim, o facto de todos os miRNAs estudados apresentarem uma tendência convergente de aumento no período noturno reforça a consistência dos resultados e sugere que a variação dos níveis de expressão que se verificou poderá refletir uma dinâmica compatível com o ritmo circadiano (Figura 15).

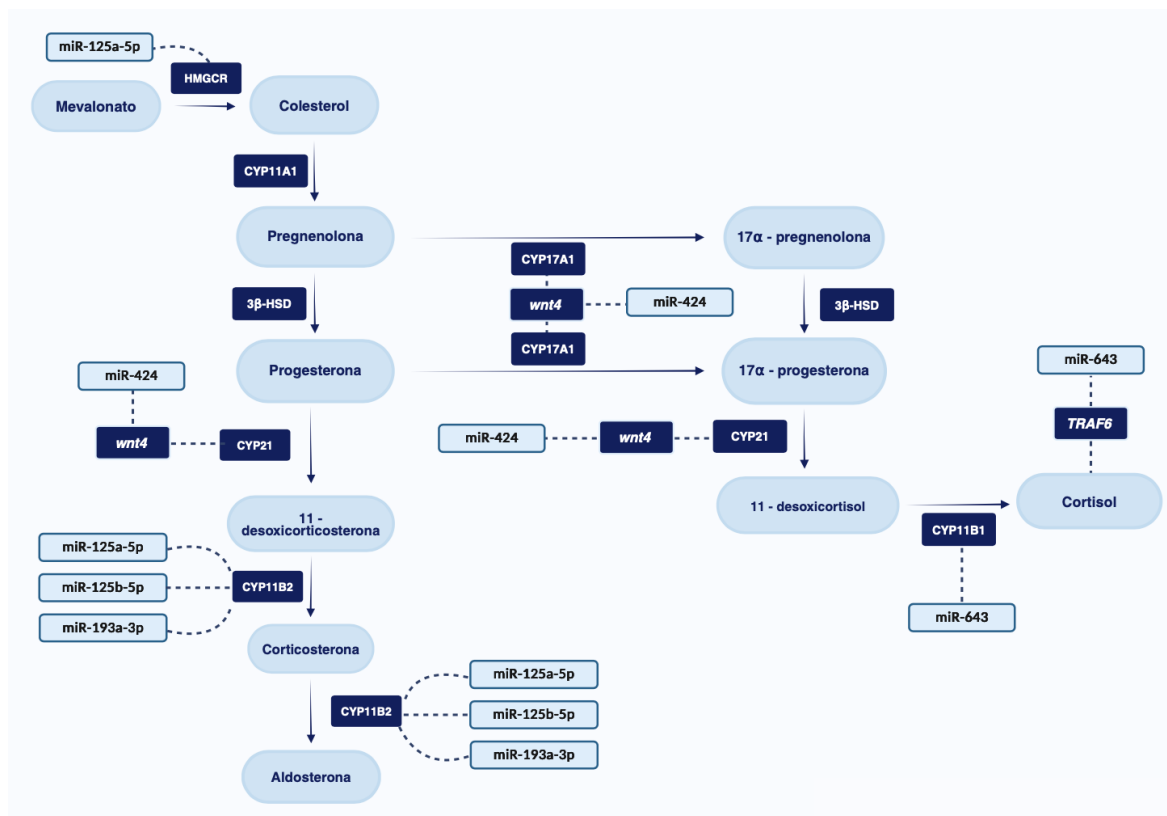


Figura 15: Relação dos miRNAs estudados com as vias de biossíntese de cortisol e da aldosterona.

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

A determinação do IPM constitui um dos grandes desafios da Medicina Legal, sendo fundamental para a reconstrução da cronologia dos factos em contexto forense. Os métodos clássicos, baseados em parâmetros físicos e bioquímicos, apresentam limitações relacionadas com a variabilidade interindividual e a influência de fatores ambientais extrínsecos, o que justifica a procura de novos métodos mais robustos e específicos. Neste contexto, os miRNAs surgem como uma via de investigação particularmente promissora, dada a sua elevada estabilidade em diferentes tipos de amostras biológicas, incluindo sangue e saliva, e pela sua capacidade de se integrar na regulação de processos moleculares dinâmicos, como o ritmo circadiano. Assim, a análise do perfil de expressão de determinados miRNAs poderá oferecer um contributo inovador para uma estimativa mais precisa do IPM, complementando os métodos tradicionais.

Com o presente estudo pretendeu-se analisar a expressão dos miRNAs hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-424 e hsa-miR-643 no contexto do ritmo circadiano e da sua possível associação com as vias de biossíntese de cortisol e da aldosterona, com vista a avaliar o seu potencial como biomarcadores na estimativa do IPM. A análise dos perfis de expressão dos miRNAs selecionados evidenciou padrões distintos ao longo do dia, mas com um comportamento convergente no período noturno, no qual se verificou um aumento expressivo da expressão de todos os miRNAs. Em contraste, os níveis de cortisol e aldosterona apresentaram um declínio nesse mesmo intervalo, o que mostrou uma tendência inversa entre a evolução diária dos níveis de miRNAs e dos níveis hormonais. Estes resultados sugerem uma possível regulação de feedback entre os miRNAs estudados e as vias de biossíntese hormonal, o que pode ser útil no contexto de determinação do IPM. Com base nos resultados obtidos, podemos afirmar que os miRNAs analisados podem ser considerados potenciais biomarcadores do ritmo circadiano aplicáveis à estimativa do IPM, sobretudo no intervalo entre os períodos da tarde e da noite, no qual os miRNAs apresentaram um aumento expressivo dos seus níveis de expressão em sentido oposto ao declínio do cortisol e da aldosterona nesse mesmo período.

Outro aspeto relevante deste estudo foi a deteção consistente de todos os miRNAs em amostras de sangue e saliva, o que reforça a viabilidade prática de ambos os fluídos biológicos em contexto forense. O uso de sangue e saliva pode representar uma limitação metodológica, dado que as características próprias de cada fluído podem influenciar os resultados, porém, essa diversidade reforça o potencial de aplicação prática dos miRNAs em diferentes contextos. Para além disso, é importante referir que a saliva se apresenta

como uma amostra particularmente vantajosa, graças à sua praticidade de recolha e por constituir um método não invasivo.

Em estudos futuros, será relevante replicar o presente trabalho numa amostra maior de indivíduos e utilizar o mesmo tipo de amostra em todos os períodos do dia, ou seja, utilizar amostras de saliva para a manhã e tarde e amostras de sangue periférico para o período noturno. Desta forma, seria possível validar a utilização das duas amostras biológicas neste tipo de estudos. Para além disso, seria importante fazer uma análise dos níveis de aldosterona ao longo de todo o dia, algo que não nos foi possível realizar neste estudo, devido à quantidade insuficiente de amostra salivar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

1. Werner U. Spitz FJD. Spitz and Fisher's Medicolegal Investigation of Death (5th ed.)2020.
2. Madea B. Methods for determining time of death. *Forensic Sci Med Pathol*. 2016;12(4):451–85.
3. Strete G, Sălcudean A, Cozma AA, Radu CC. Current Understanding and Future Research Direction for Estimating the Postmortem Interval: A Systematic Review. *Diagnostics (Basel)*. 2025;15(15).
4. Traunfellner Z. [Paolo Zacchia--the father of forensic medicine, 400 years after his birth]. *Z Rechtsmed*. 1985;94(2):159–63.
5. Rosa ECZ. RIGOR E LIVOR MORTIS: O FUNCIONAMENTO DO CORPO HUMANO APÓS A MORTE SOB A ÓTICA DA MEDICINA LEGAL E TANATOLOGIA FORENSE. . *Revista Tópicos*. 2024;2.
6. Baptista AMdC. Estimativa do Intervalo Postmortem a Partir da Composição Química Óssea Analisada por FTIR-ATR: Universidade de Coimbra; 2020.
7. Metcalf JL, Wegener Parfrey L, Gonzalez A, Lauber CL, Knights D, Ackermann G, et al. A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *eLife*. 2013;2:e01104.
8. Naia MJT. Determinação do Intervalo Postmortem através do decréscimo de citrato e DNA em ossos: Influência das condições tropicais. 2014.
9. Henssge C, Madea B. Estimation of the time since death. *Forensic Sci Int*. 2007;165(2-3):182–4.
10. Ruiz López JL, Partido Navadijo M. Estimation of the post-mortem interval: a review. *Forensic Science International*. 2025;369:112412.
11. Heinrich F, Rimkus-Ebeling F, Dietz E, Raupach T, Ondruschka B, Anders-Lohner S. An assessment of the Henssge method for forensic death time estimation in the early post-mortem interval. *Int J Legal Med*. 2025;139(1):105–17.
12. Ruiz López JL, Partido Navadijo M. Estimation of the post-mortem interval: a review. *Forensic Sci Int*. 2025;369:112412.
13. Lara Silva NRS, Aline Gama, Rafael Machado. Forensic entomology for estimation of post-mortem interval (PMI): integrative review. 2024.
14. Cadete ACA. Estudo dos períodos de pré-colonização e oviposição de dípteros colonizadores primários de cadáveres durante a noite e o dia: Instituto Universitário Egas Moniz; 2021.
15. Puja Rani Bhuyan BKB, Prarthna Rajkumari, Budah Bora, Nirmali Borah and Shereen Chaya. Forensic entomology: Unraveling the secrets of insect

- evidence. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*. 2025.
16. Cainé LSRM. *Entomologia Forense: Identificação Genética de Espécies em Portugal*: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2010.
17. Cavalcanti MS. Importância forense de espécies de coleópteros na estimativa do intervalo pós-morte: Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2022.
18. Scrivano S, Sanavio M, Tozzo P, Caenazzo L. Analysis of RNA in the estimation of post-mortem interval: a review of current evidence. *International Journal of Legal Medicine*. 2019;133(6):1629–40.
19. Sampaio-Silva F, Magalhães T, Carvalho F, Dinis-Oliveira RJ, Silvestre R. Profiling of RNA degradation for estimation of post mortem [corrected] interval. *PLoS One*. 2013;8(2):e56507.
20. Zissler A, Stoiber W, Steinbacher P, Geissenberger J, Monticelli FC, Pittner S. Postmortem Protein Degradation as a Tool to Estimate the PMI: A Systematic Review. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(12).
21. Mermet J, Yeung J, Naef F. Systems Chronobiology: Global Analysis of Gene Regulation in a 24-Hour Periodic World. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(3).
22. Pinto JR. *microRNAs como biomarcadores do ritmo circadiano*: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar; 2019.
23. Halberg F. Chronobiology. *Annual Review of Physiology*. 1969;31(Volume 31, 1969):675–726.
24. Mosko T. O que é Ciclo Ultradiano do Sono? Thays Mosko NEUROFEEDBACK2023 [Available from: <https://thaysmosko.com.br/glossario/o-que-e-ciclo-ultradiano-do-sono/>].
25. Costa A. O ritmo ultradiano: prensando nossa produtividade de modo cíclico Medium2014 [Available from: <https://movebla.com/o-ritmo-ultradiano-prensando-nossa-produtividade-de-modo-cíclico-9954ca0b2aea>].
26. Hedge PA. *Biological Rhythms*. Cornell University; 2013.
27. Huang G, Ma H, Gan X, Li S, Ma X, Chen S, et al. Circadian misalignment leads to changes in cortisol rhythms, blood biochemical variables and serum miRNA profiles. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;567:9–16.
28. Bailey SL, Heitkemper MM. Circadian rhythmicity of cortisol and body temperature: morningness-eveningness effects. *Chronobiol Int*. 2001;18(2):249–61.
29. Emery P, Klarsfeld A, Stanewsky R, Shafer OT. Sensitive Timing: A Reappraisal of Chronobiology’s Foundational Texts. *Journal of Biological Rhythms*. 2023;38(3):245–58.

30. Hastings MH, Maywood ES, Brancaccio M. The Mammalian Circadian Timing System and the Suprachiasmatic Nucleus as Its Pacemaker. *Biology (Basel)*. 2019;8(1).
31. Leila Lima NV. O Relógio Biológico e os ritmos circadianos de mamíferos: uma contextualização histórica. *Revista da Biologia*. 2014;12:1–7.
32. Hasan FAAPdAR. Mecanismos do ciclo sono-vigília. *Brazilian Journal of Psychiatry*. 2005.
33. Moreira TSdS. MicroRNAs salivares como biomarcadores nas ciências forenses: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar; 2022.
34. Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol*. 2014;24(2):90–9.
35. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet*. 2006;15 Spec No 2:R271–7.
36. Gnocchi D, Bruscalupi G. Circadian Rhythms and Hormonal Homeostasis: Pathophysiological Implications. *Biology (Basel)*. 2017;6(1).
37. Kanikowska D, Roszak M, Rutkowski R, Sato M, Sikorska D, Orzechowska Z, et al. Seasonal differences in rhythmicity of salivary cortisol in healthy adults. *J Appl Physiol* (1985). 2019;126(3):764–70.
38. Fries E, Dettenborn L, Kirschbaum C. The cortisol awakening response (CAR): facts and future directions. *Int J Psychophysiol*. 2009;72(1):67–73.
39. Stratakis CA, Chrousos GP. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;771:1–18.
40. Sharma LTJGS. Physiology, Cortisol. *StatPearls*. 2023.
41. Chung S, Son GH, Kim K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(5):581–91.
42. Dunn JHSMAMRJ. Physiology, Aldosterone. 2023.
43. Lappin JHFJKSL. Physiology, Renin Angiotensin System. *StatPearls*. 2023.
44. Martínez-Jiménez D, Hernández Del Rincón JP, Sabater-Molina M, Pérez-Martínez C, Torres C, Pérez-Cárceles MD, et al. Postmortem study of adrenomedullin and cortisol in femoral serum and pericardial fluid related to acute pulmonary edema. *Int J Legal Med*. 2025;139(1):353–9.
45. Ackermann K, Ballantyne KN, Kayser M. Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: a prospective and versatile tool for crime scene reconstruction. *International Journal of Legal Medicine*. 2010;124(5):387–95.
46. Żulicka M, Sobczak K, Kowalczyk D, Sikorska S, Arendt W, Hałas-Wiśniewska M. Detection of Deaths Caused by Hyperkalemia. *Biomedicines*. 2025;13(1):222.
47. Thosar SS, Rueda JF, Berman AM, Lasarev MR, Herzig MX, Clemons NA, et al. Separate and interacting effects of the endogenous circadian system and behaviors on

- plasma aldosterone in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2019;316(2):R157–r64.
48. Pruessner JC, Wolf OT, Hellhammer DH, Buske-Kirschbaum A, von Auer K, Jobst S, et al. Free cortisol levels after awakening: a reliable biological marker for the assessment of adrenocortical activity. *Life Sci*. 1997;61(26):2539–49.
 49. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(5):1526–40.
 50. Kopanos S, Feldkamp J. Diagnostic and Therapeutic Challenges in Concurrent Addison's Disease and Acromegaly. *Cureus*. 2025;17(7):e88323.
 51. Souêtre E, Salvati E, Belugou JL, Pringuey D, Candito M, Krebs B, et al. Circadian rhythms in depression and recovery: evidence for blunted amplitude as the main chronobiological abnormality. *Psychiatry Res*. 1989;28(3):263–78.
 52. Kline GA, Leung AA, Orton D, MacFarlane J, Gurnell M. Is it time to retire confirmatory testing for primary aldosteronism? *Am J Hypertens*. 2025.
 53. Adelina Ameti EZ, Ali Gilani, Adamo Michela, Vionnet Nathalie, Raul Nicoli, Nicolas Niederlander, Paal Methlie, Thomas Upton, Adrian Ionescu, Nelly Pitteloud. Diurnal pattern of secretion of cortisol, Aldosterone and 18-hydroxycortisol levels in four biological fluids in healthy volunteers. *Endocrine Abstracts*. 2025.
 54. Lee H, Lee EJ, Park K, Lee DG, Kim AY, Park S, et al. MicroRNA transcriptome analysis for post-mortem interval estimation. *Forensic Science International*. 2025;370:112473.
 55. Budakoti M, Panwar AS, Molpa D, Singh RK, Büsselberg D, Mishra AP, et al. Micro-RNA: The darkhorse of cancer. *Cell Signal*. 2021;83:109995.
 56. Dave VP, Ngo TA, Pernestig AK, Tilevik D, Kant K, Nguyen T, et al. MicroRNA amplification and detection technologies: opportunities and challenges for point of care diagnostics. *Lab Invest*. 2019;99(4):452–69.
 57. Cowland JB, Hother C, Grønbaek K. MicroRNAs and cancer. *Apmis*. 2007;115(10):1090–106.
 58. Silva SS, Lopes C, Teixeira AL, Carneiro de Sousa MJ, Medeiros R. Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int Genet*. 2015;14:1–10.
 59. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res*. 2011;717(1-2):85–90.
 60. Sun BK, Tsao H. Small RNAs in development and disease. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59(5):725–37; quiz 38–40.
 61. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;Volume 9 - 2018.

62. Rocchi A, Chiti E, Maiese A, Turillazzi E, Spinetti I. MicroRNAs: An Update of Applications in Forensic Science. *Diagnostics (Basel)*. 2020;11(1).
63. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 2014;20(8):460–9.
64. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):597–610.
65. Seashols-Williams S. Verification and Evaluation of a miRNA Panel for Body Fluid Identification Using DNA Extracts, United States, 2019-2021. Inter-university Consortium for Political and Social Research [distributor]; 2024.
66. Suo L, Cheng J, Yuan H, Jiang Z, Tash D, Wang L, et al. miR-26a/30d/152 are reliable reference genes for miRNA quantification in skin wound age estimation. *Forensic Sciences Research*. 2023;8(3):230–40.
67. Na JY. Estimation of the post-mortem interval using microRNA in the bones. *J Forensic Leg Med*. 2020;75:102049.
68. Ahmad MA, ghaleb SS, Zaki AR, Kamel AO, Abdalla AGS. Estimation of the post-mortem interval using microRNA in the heart in aluminum phosphide deaths. *Egyptian Journal of Medical Research*. 2024;5(3):24–34.
69. Robertson S, Diver LA, Alvarez-Madrado S, Livie C, Ejaz A, Fraser R, et al. Regulation of Corticosteroidogenic Genes by MicroRNAs. *Int J Endocrinol*. 2017;2017:2021903.
70. Nusrin S, Tong SK, Chaturvedi G, Wu RS, Giesy JP, Kong RY. Regulation of CYP11B1 and CYP11B2 steroidogenic genes by hypoxia-inducible miR-10b in H295R cells. *Mar Pollut Bull*. 2014;85(2):344–51.
71. Robertson S, MacKenzie SM, Alvarez-Madrado S, Diver LA, Lin J, Stewart PM, et al. MicroRNA-24 is a novel regulator of aldosterone and cortisol production in the human adrenal cortex. *Hypertension*. 2013;62(3):572–8.
72. Peng KY, Chang HM, Lin YF, Chan CK, Chang CH, Chueh SJ, et al. miRNA-203 Modulates Aldosterone Levels and Cell Proliferation by Targeting Wnt5a in Aldosterone-Producing Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(10):3737–47.
73. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
74. Liu K, Wang R. MicroRNA-mediated regulation in the mammalian circadian rhythm. *J Theor Biol*. 2012;304:103–10.
75. Khan F. The Luciferase Reporter Assay: How it Works 2013 [Available from: <https://bitesizebio.com/10774/the-luciferase-reporter-assay-how-it-works/>].
76. Wood S. Regulation of adrenal corticosteroidogenesis: the role of microRNAs in the control of aldosterone synthase and 11 β -

hydroxylase expression.: University of Glasgow; 2012.

77. Ye D, Lou GH, Li AC, Dong FQ, Chen GP, Xu WW, et al. MicroRNA-125a-mediated regulation of the mevalonate signaling pathway contributes to high glucose-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Mol Med Rep.* 2020;22(1):165–74.
78. Zhang G, Zou X, Liu Q, Xie T, Huang R, Kang H, et al. MiR-193a-3p functions as a tumour suppressor in human aldosterone-producing adrenocortical adenoma by down-regulating CYP11B2. *Int J Exp Pathol.* 2018;99(2):77–86.
79. Yamaguchi T, Takamura M, Tochigi H, Mizuno Y, Mizuno Y, Sato T, et al. Loss of miR-424 and miR-503 promotes decidualization of human endometrial stromal cells by increasing SCARA5 expression. *Med Mol Morphol.* 2025.
80. El Wakil A, Lalli E. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;332(1-2):32–7.
81. Yin H, Shao J. MicroRNA-643 promotes proliferation and inhibits apoptosis of papillary thyroid carcinoma by down-regulating the cytochrome P450 family member 11B1. *Transl Cancer Res.* 2020;9(3):1465–75.
82. Yamamoto M, Gohda J, Akiyama T, Inoue JI. TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) plays crucial roles in multiple biological systems through polyubiquitination-mediated NF-κB activation. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2021;97(4):145–60.
83. Lv H, Yan C, Deng L, Peng Z, Yang D, Hu W, et al. Role of MicroRNAs in Protective Effects of Forsythoside A Against Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Bovine Endometrial Stromal Cells. *Front Vet Sci.* 2021;8:642913.
84. Oladejo AO, Li Y, Imam BH, Ma X, Shen W, Wu X, et al. MicroRNA miR-24-3p Mediates the Negative Regulation of Lipopolysaccharide-Induced Endometrial Inflammatory Response by Targeting TNF Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6). *Journal of Inflammation Research.* 2022;15(null):807–25.