



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MIR-381-3P, MIR-23B-3P Y MIR-144-3P EN
UN MODELO MURINO COMO POSIBLES BIOMARCADORES PARA ESTIMAR**

EL INTERVALO POST-MORTEM

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. MARTINEZ RIVERA VANESSA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ MARIANO GUARDADO ESTRADA
LICENCIATURA EN CIENCIA FORENSE, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS PÉREZ PLASENCIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.
DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA.
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
OFICIO CPCB/817/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión virtual del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **24 de agosto de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **MARTÍNEZ RIVERA VANESSA** con número de cuenta **309219525** con la tesis titulada **“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN miR-381-3p, miR-23b-3p y miR-144-3p EN UN MODELO MURINO COMO POSIBLES BIOMARCADORES PARA ESTIMAR EL INTERVALO POST-MORTEM”**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ MARIANO GUARDADO ESTRADA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
Vocal: DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES
Secretario: DR. CARLOS PÉREZ PLASENCIA
Suplente: DR. JUAN MIRANDA RÍOS
Suplente: DRA. BLANCA ORTÍZ QUINTERO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 03 de diciembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

Al CONACyT por el apoyo económico que me brindó para realizar mis estudios de Maestría (CVU: 923416)

Al apoyo otorgado por PAPIIT (IA204420)

Al Dr. José Mariano Guardado Estrada que fungió como mi tutor durante mis estudios de maestría

Al Dr. Pérez Plasencia Carlos por formar parte del comité tutorial y el apoyo brindado durante todo el proyecto de maestría

Al Dr. Hidalgo Miranda Alfredo por formar parte del comité tutorial y el apoyo brindado durante todo el proyecto de maestría

Contenido

Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción	3
1.1 Intervalo Post-mortem	3
1.2 Métodos para estimar el IPM	5
1.3 microRNA	6
II. Justificación	9
III. Hipótesis	9
IV. Objetivos	10
4.1 Objetivos generales	10
4.2 Objetivos particulares	10
V. Metodología	11
5.1 Toma de muestra	11
5.2 Extracción y cuantificación del RNA total	11
5.3 cDNA/PCR punto final	12
5.4 RT-qPCR	13
5.5 Predicción de genes blancos de miR-23b-3p y miR-381-3p.....	14
5.6 Análisis estadístico	15
VI. Resultados	16
6.1 Evaluación morfológica interna y externa	16
6.2 Análisis del RNA total	20
6.3 Determinación de los niveles de expresión de miR- 23b-3p, miR-381-3p y miR-144-3p	21
6.4 Análisis de los procesos biológicos de mir-381-3p y mir-23-3p	23
VII. Discusión	25
VIII. Conclusiones	32
IX. Aportaciones	33

X. Perspectivas	33
XI. Referencias Bibliográficas	34
Anexo I. Galería de cambios morfológicos Post-mortem	47

RESUMEN

El intervalo post-mortem (IPM) se define como el tiempo transcurrido desde la muerte de un individuo, hasta que su cuerpo es encontrado, y es de gran importancia para fines forenses. Esta estimación se realiza mediante los cambios morfológicos del cadáver, pero esto es cualitativo y depende de la experiencia del médico legista. Se han utilizado diversos elementos como los ácidos nucleicos, sin embargo, no se ha encontrado ninguna asociación entre su expresión y el IPM. Los miRNA regulan la expresión genética y se han investigado como biomarcadores. Debido a que son de tamaño pequeño, pueden soportar mejor la degradación, lo que los hace adecuados para estudios forenses. El objetivo del trabajo fue cuantificar los niveles de miR-381-3p, miR-23b-3p y miR-144-3p en músculo esquelético de rata como posibles biomarcadores del IPM temprano (0, 3, 6, 12 y 24 h- PMI). Los resultados mostraron un aumento en los cambios morfológicos post-mortem en las ratas respecto al tiempo. También se observó la degradación del RNA principalmente a las 24 h, sin embargo, el gen constitutivo B-actina (ACTB) se transcribió hasta las 24 h. Por lo tanto, a pesar de la degradación del RNA, se mantuvieron transcritos de RNAm. También de los tres miRNA analizados, se encontró un aumento en la expresión de miR-381-3p y una disminución de la expresión de miR-23b-3p en las primeras 24h de IPM, los cuales fueron cuantificados por RT-qPCR. Así mismo, se reportaron cambios estadísticamente significativos al comparar el Fold Change (FC) de las 0 y 24h de IPM en ambos miRNAs. Los genes blanco de estos dos miRNAs fueron estimados mediante un análisis bioinformático. Los resultados indicaron que estos genes participan en las vías biológicas relacionadas con la hipoxia, la detección del oxígeno o la transcripción de RNA. Por lo tanto, es probable que estas vías se encuentren activas o inactivas al menos las primeras 24h. Los resultados actuales sugieren que miR-23b-3p y miR-381-3p se asocia al IPM temprano, que probablemente regula la expresión de algunos genes involucrados en apoptosis e inflamación y a su vez están relacionados con la autólisis. Asimismo, se sugiere que la expresión del gen miR-381-3p y miR-23b-3p podrían ser estimadores potenciales del IPM.

ABSTRACT

Post-mortem interval (PMI) is defined as the time elapsed from the death of an individual, until the body is found, which is relevant for forensic purposes. For another hand, MiRNAs regulate gene expression and have been investigated as biomarkers, and because of their small size they can better withstand degradation, making them suitable for forensic purposes. In the present work we evaluated the gene expression of miR-381-3p, miR-23b-3p and miR-144-3p as possible biomarkers of early PMI (0, 3, 6, 12 and 24 h-PMI) in skeletal muscle of a murine model. The murine model presented the expected changes according to what was reported in humans, likewise, the degradation of the RNA occurred mainly after 24h. However, transcription of the constitutive ACTB gene continued until 24 h, therefore, despite RNA degradation, mRNA transcripts continued to exist. Also, of the three miRNAs analyzed, we found changes in the expression of miR-381-3p and miR-23b-3p, when comparing the Fold Change (FC) of these miRNAs between 0 and 24 h of PMI. When we analyzed the gene expression of these two miRNAs during the first 24 h of PMI, the expression of the miR-23b-3p gene decreased, while the expression of miR-381-3p increased. The target genes of these two miRNAs participate in biological pathways related to hypoxia, detection of oxygen depletion, or RNA transcription, therefore, these pathways are likely to be active or inactive for at least the first 24h. The current results suggest that miR-23b-3p and miR-381-3p participate in early PMI, which probably regulates the expression of some genes involved in apoptosis and inflammation and in turn related to autolysis. Likewise, it is suggested that the expression of the miR-381-3p and miR-23b-3p gene could be potential estimators of PMI. More studies are required to confirm these results, as well as to analyze other miRNAs that may be involved in the autolysis process.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 INTERVALO POST-MORTEM

En casos judiciales, especialmente en aquellos relacionados con muertes no naturales o sospechosas, la determinación del intervalo post-mortem (IPM) es un tema importante de aspecto legal y médico-forense [1]. El IPM es el tiempo transcurrido desde el deceso de una persona hasta que se encuentra su cadáver, por lo que es un componente clave en las investigaciones forenses [2]. El IPM se puede dividir en temprano y en tardío; el IPM temprano comprende horas y algunos días y se determina principalmente por los cambios morfológicos del cuerpo. Por otro lado, el IPM tardío puede abarcar semanas, meses y años y para determinarlo se utiliza principalmente la entomología forense [1].

Los principales cambios morfológicos utilizados para estimar el IPM temprano son: *Algor mortis* (AM), *Livor mortis* (LM) y *Rigor mortis* (RM) [3]. Sin embargo, existen otros cambios que podrían coadyuvar a la estimación como la desecación (DR), la distensión abdominal (AD), la coloración verde abdominal (AGD), entre otros [3]. Estos cambios se presentan de manera secuencial y el tiempo en el que aparecen varía según las condiciones pre-mortem, la causa de muerte, la temperatura, la humedad, entre otros [4].

El AM es el decaimiento de la temperatura del cuerpo posterior a la muerte hasta lograr el equilibrio con el medio ambiente. Esto debido al cese de los procesos metabólicos normales del cuerpo que mantienen la temperatura interna. En la mayoría de los casos los cuerpos se enfrían después de la muerte a una velocidad aproximada de 0.834°C por hora [4,5]. Sin embargo, el enfriamiento del cuerpo depende de diferentes factores como la temperatura ambiente, la masa muscular del cadáver e incluso las condiciones pre-mortem del mismo [6].

El RM es el endurecimiento muscular posterior a la muerte, el cual está dado por cambios en las miofibrillas de los tejidos musculares. A medida que el ATP se convierte en ADP y se produce ácido láctico disminuyendo el pH celular, se forman puentes químicos de bloqueo entre la actina y la miosina, lo que resulta en

la formación de rigor [3]. Éste inicia aproximadamente de 2-6 horas y comienza con el rigor mortis superior (RMS) para continuar en la parte inferior (RML); éste puede permanecer de 18 a 36 h y se elimina gradualmente haciendo que los músculos se vuelvan flácidos de nuevo [7–9]. Asimismo, el *Rigor mortis* depende de diversos factores externos como la temperatura ambiental, y por variaciones individuales como edad, sexo, masa muscular, actividad física y la causa de muerte [7].

El LM es la decoloración del cuerpo después de la muerte debido al asentamiento gravitacional de la sangre e inicia aproximadamente 1h después de la muerte. La coloración se vuelve "fija" en aproximadamente 8-10 horas; lo que indica que si el cuerpo es cambiado de posición durante este periodo la intensidad de la coloración puede disminuir. Posterior a la fijación, aunque el cuerpo sea cambiado de posición, la intensidad de la coloración no cambiará [3,5,10,11].

Existen otros cambios morfológicos que indican el inicio de la descomposición, dentro de ellos se encuentran la DR que es el cambio aparente en la textura y coloración de mucosas y piel, principalmente en las zonas con piel delgada [10]. También podemos observar la producción de lixiviado que es la expulsión del líquido de la licuefacción por los orificios del cuerpo [12]. Así como, AD y coloración verde abdominal (AGD), ambos son ocasionados por la descomposición bacteriana y la acumulación de gases dentro de la cavidad abdominal [3,5,12].

Los cambios internos que se presentan en el cuerpo pueden deberse a la acción de la descomposición las proteínas y la acción de microorganismos en los órganos y tejidos. El fenómeno de licuefacción se presenta principalmente en hígado y cerebro [3,12,13]. Otro fenómeno que puede observarse en los tejidos es el LM, el cual se presenta en tejidos con alta irrigación sanguínea, como los pulmones [14].

Además, la célula sufre un tipo de muerte celular llamado autólisis, el cual es un tipo de muerte celular diferente de la apoptosis y necrosis [12]. La autólisis se caracteriza por la autodestrucción de la célula a través de las enzimas hidrolíticas

localizadas principalmente en los lisosomas, los peroxisomas y, en menor medida, las mitocondrias [13, 15, 16].

La presencia de estos cambios post-mortem, así como la velocidad en que se presentan va a depender de diversos factores como las condiciones ambientales, las condiciones pre-mortem y post-mortem del cuerpo, entre otros [17]. Desafortunadamente el uso de estos cambios post-mortem para estimar el IPM es un tanto subjetivo y no cuantitativo por lo que estos cambios están sujetos a la interpretación del médico forense [18]. Con base en esto, es importante investigar nuevos métodos cuantitativos que permitan la estimación del IPM.

1.2 METODOS PARA ESTIMAR EL IPM

Actualmente, no existe un método único que pueda determinar con precisión el momento de la muerte, por lo tanto, es necesario la colaboración de especialistas en medicina, antropología y odontología forense para determinarlo [1]. Una alternativa que se propone es mediante el uso algunos elementos bioquímicos que buscan tener estimados más precisos del IPM.

Se ha utilizado la detección de algunas sustancias como el potasio (K), el sodio (Na), el calcio (Ca), el cloruro y, por otro lado, la glucosa en líquido sinovial y el suero para la estimación del IPM [19–22]. También, se ha utilizado la concentración del K, la hipoxantina y el triptófano en el humor vítreo para el cálculo del IPM [23–25]. Sin embargo, estos métodos no son exactos para dicha estimación ya que las concentraciones pueden depender de otros factores ambientales, el tipo de muerte y las condiciones pre-mortem [26,27].

Entre los métodos que se han tratado de utilizar para la estimación del IPM, está la degradación del DNA y RNA en muestras de tejido humano y ratas [28–30]. Sin embargo, no existe una relación entre el IPM y la degradación de los ácidos nucleicos ya que dependen de diversos factores, así como del tejido analizado y la estabilidad del ácido nucleico [31]. A pesar de la degradación del RNA, recientemente se ha observado la expresión de diversos transcritos a diferentes

IPM en humano, rata, ratón y pez cebra [32–34]. Pozhitkov y colaboradores [32] identificaron los transcritos de RNAm mediante microarreglos en pez cebra e hígado y cerebro de ratón durante diferentes intervalos postmortem. Los autores reportaron un aumento en la transcripción de 1063 genes involucrados en epigenética, inflamación, apoptosis, entre otros procesos biológicos; hasta las 96 horas post mortem.

Por otro lado, Ferreira y colaboradores [33] estudiaron la expresión de diversos genes en humano, y encontraron que su expresión cambia en IPM relativamente cortos y varían dependiendo el tejido analizado. Los autores reportaron que estos genes están involucrados en diversas vías, como la epigenética. Finalmente, Zapico y colaboradores [34], analizaron la expresión de Fas Ligando (FasL) y el homólogo de fosfatasa y tensina (PteN) en músculo gastrocnemio de rata en IPM temprano y lo que encontraron fue un cambio en la cantidad de transcrito de estos genes conforme incrementaba el IPM.

Esta actividad transcripcional sugiere que las células podrían tener actividad horas después de la muerte del individuo y, por lo tanto, podrían existir genes involucrados en el proceso de autólisis, así como la regulación.

1.3 MICRORNAS

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes de ~22 nucleótidos de origen endógeno que regulan la expresión genética a nivel post-transcripcional mediante el bloqueo de la traducción o la degradación de mRNA codificantes o genes blanco. Los miRNAs se presentan en plantas, animales y algunos virus [35].

En la figura 1 se muestra la biogénesis de los miRNAs, que generalmente inicia en el núcleo mediante acción de la RNA polimerasa II, que genera un miRNA primario (pri-miRNA) [36]. Posteriormente se procesa para generar un pre-miRNA mediante un microprocesador integrado por la enzima Drosha y la proteína DGCR8, así como algunos factores auxiliares (DDX5, DDX17, etc). El pre-miRNA es exportado al citoplasma por Exportina 5 (Exp5) y la enzima Dicer procesa el pre-miRNA en

un RNA de doble cadena de 20-25 nucleótidos [36–38]. El miRNA de doble cadena es reclutado por el complejo proteico llamado RISC a través de su componente Argonauta (AGO). Una de las cadenas se disocia y se retiene una sola cadena (cadena guía), en el complejo miRISC. La cadena guía reconoce la región no traducida (UTR), de su RNAm objetivo que tiene una secuencia parcial complementaria; sin embargo, esta unión debe exhibir una complementariedad perfecta en una región de 2 a 8 nucleótidos llamada región de semilla, que se encuentra en el extremo 5' del miRNA. La unión del miRNA a su RNAm objetivo generalmente se realiza en la región UTR 3' e induce el bloqueo de la traducción por tres posibles mecanismos: represión de la traducción, degradación de RNAm y desestabilización de RNAm. La degradación de los mRNA diana de los miARN es catalizada por enzimas involucradas en la vía celular de desintegración del ARNm de 5' a 3', el cual desadenilan (deadenylation), decapitan (decapped) y son degradados por nucleasas citoplasmáticas [38–40].

Los miRNAs además de silenciar los mRNAs, también se han reportado que en algunos casos pueden modular la expresión genética a nivel transcripcional, por unión a la región promotora e induciendo la transcripción de ciertos genes [41]. Por lo tanto, los miRNAs regulan múltiples procesos celulares, como el ciclo celular, la apoptosis, la inflamación y la necrosis. Estos procesos están involucrados en la descomposición del cuerpo, además, por su tamaño pueden soportar la degradación por lo que podrían ser buenos biomarcadores [42–44]. Con base en esto último, es probable que los microRNAs puedan estar regulando el proceso de autólisis.

Se han reportado diversos miRNAs que regulan los procesos de apoptosis e inflamación, así como su desregulación en diferentes enfermedades, dentro de ellos se encuentran los miRNAs: miR-381-3p, miR-23b-3p y miR-144-3p [42,46]. Se ha observado la desregulación de miR-381-3p en diversos cánceres como cervical [46], carcinoma papilar de tiroides [48] o cáncer de mama [49], en donde participa principalmente en vías relacionadas con la apoptosis celular. También, se ha observado la desregulación de miR-23b-3p en carcinoma hepatocelular [50] y

osteosarcoma [45]; así como en osteoartritis [51], células epiteliales del cristalino en cataratas por edad [52] y fibrosis epidural [53]. En estas enfermedades se ha visto que miR-23b-3p participa en las vías relacionadas con inflamación y apoptosis. Finalmente, también se ha visto la participación de miR-114-3p en las vías de apoptosis e inflamación, así como su desregulación principalmente en osteoartritis [46], células de carcinoma adenoide salival [54] y cáncer de pulmón [43]. Además, se han reportado la expresión algunos miRNAs en diversos tejidos de humano, rata y ratón a diversos IPM y diferentes temperaturas [55–58]. Los miRNAs miR-381-3p, miR-23-3p y miR-144-3p regulan n BCL6, PROK2 e IL15RA, respectivamente [41, 59, 60]. Que, a su vez, estos genes están involucrados en las vías de inflamación y apoptosis, además, estas vías se encuentran activas en las células después de la muerte (32, 33). Por lo tanto, estos miRNAs podrían estar diferencialmente expresados a diferentes IPM y además también estar involucrados en el proceso de autólisis celular.

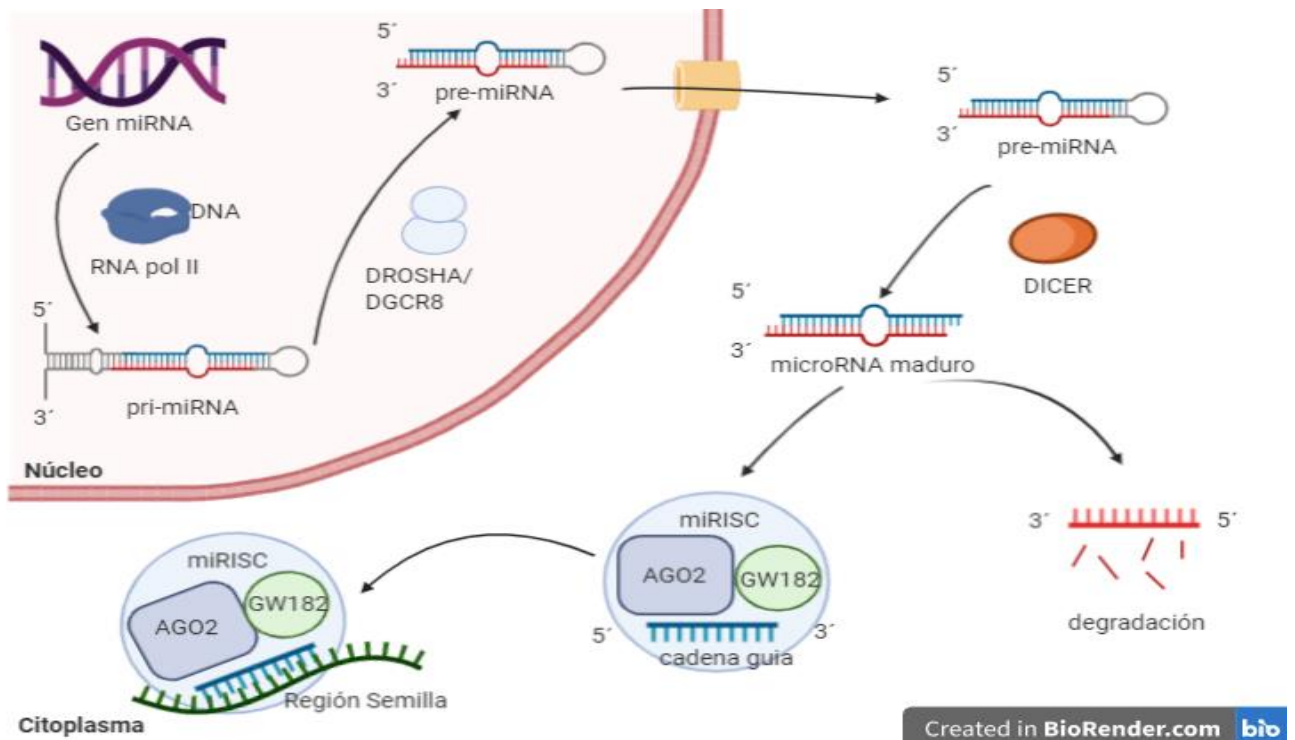


Figura 1. Biogénesis de los microRNAs en la célula. Los precursores de miRNA se transcriben en el núcleo, se exportan al citoplasma y es procesado hasta formar un miRNA maduro, y poder silenciar a los mRNA.

II. JUSTIFICACION

La estimación del IPM es subjetiva y con un margen de error que depende de las condiciones ambientales y pre-mortem de cada individuo. Los miRNAs son resistentes a la degradación, presentan un valor clínico como posibles biomarcadores para diversas enfermedades y participan como reguladores de la expresión génica de múltiples procesos celulares, se proponen como biomarcadores potenciales para el IPM. En este estudio se propone el uso de los miRNA miR-381-3p, miR-23b-3p y miR-144-3p, que están involucrados en los procesos de inflamación y apoptosis, como probables biomarcadores del IPM en músculo esquelético de rata Wistar. Aunado a lo anterior, también nos permitirá analizar *in silico* las posibles vías que se están activando en la célula post-mortem para ayudar a definir la autólisis celular.

III. HIPOTESIS

Los niveles de microRNAs miR-381-3p, miR-23b-3p y miR-144-3p, están asociados a inflamación y apoptosis, y a su vez estos procesos celulares se presentan en el cuerpo después de la muerte, cambiarán en las células de músculo esquelético en las ratas Wistar a diferentes IPM lo cual podrá ser utilizado como biomarcadores para la estimación del IPM.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la cantidad de transcrito de miR-381-3p, miR-23b-3p y miR-144-3p como posibles biomarcadores asociados a los intervalos post-mortem en el músculo esquelético de rata Wistar.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar un modelo murino en condiciones ambientales controladas empleando ratas Wistar.
- Analizar cualitativamente la integridad del RNA mediante la expresión del gen constitutivo β - actina (*ACTB*) mediante PCR punto final.
- Cuantificar los transcritos de miR-381-3p, miR-23b-3p y miR-144-3p en intervalo post-mortem mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) en musculo de rata a las 0, 3, 6 12 y 24 h de Intervalo Post-mortem.
- Analizar *in silico* los procesos biológicos en los que podrían estar participando los miRNAs que podrían ser posibles biomarcadores para el IPM

V. METODOLOGIA

5.1. TOMA DE MUESTRA

Para el presente estudio, se seleccionaron aleatoriamente un total de 25 ratas Wistar machos con un peso promedio de 200 +/- 20 gr. Estas ratas se clasificaron en cinco grupos, que corresponden a las 0, 3, 6, 12 y 24 horas de intervalo post-mortem (h-IPM) y se sacrificaron por dislocación cervical. Las 0 h-IPM se consideró como el grupo control. Tras la dislocación cervical, las ratas de los grupos de 3, 6, 12 y 24 h-IPM se colocaron en una cámara climática Binder KBW 2400 con una temperatura constante de 25°C con un periodo de luz y oscuridad de 12 horas (h) para el IPM 24. Después de transcurrido el tiempo de IPM en cada grupo, se evaluó la presencia de cambios morfológicos internos y externos en cada rata de manera cefalocaudal. Una vez realizada la evaluación, se obtuvieron 200 mg de muestra de músculo femoral y se almacenaron a - 80°C hasta su procesamiento. Con respecto al grupo control, las ratas se sacrificaron e inmediatamente se evaluaron los cambios morfológicos internos, externos y se tomó una muestra de tejido muscular. Todos los procedimientos fueron evaluados y aprobados por el comité ético y científico y el comité para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con el número de aprobación 102-2018 y se realizaron de acuerdo con las normas locales (NOM-062-ZOO-1999) e internacionales de manipulación de animales de laboratorio.

5.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA TOTAL

Para la extracción de RNA total se utilizaron entre 50-100 mg de tejido ultracongelado, los cuales fueron colocados para su lisis en un tubo con perlas de vidrio de 2 mm (ZR BashingBead Lysis Tubes, Zymo Research) y se añadió 1 mL de Trizol™ Reagent (Invitrogene, Thermo Fisher). Posteriormente los tubos se colocaron en un MagNA Lyser Instrument (Roche) a 6000 rpm por un pulso de 30 segundos (s) y el sobrenadante se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 200 µL de cloroformo y se incubó por 3 min en hielo. Después, se centrifugó a 12000 g

durante 15 min a 4°C y se recuperó la fase acuosa en un tubo de 1.5 mL. Se añadieron 500 µL de Isopropanol y se dejó incubar a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de etanol al 75%. Finalmente, se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y el pellet se dejó secar por 10 min a temperatura ambiente. El RNA se resuspendió en 50 µL de agua libre de RNasas.

La concentración y pureza del RNA fue evaluado por análisis espectrofotométrico usando un NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific) y un 1 µL de muestra.

Para evaluar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con TBE al 0.5x. Mediante una cámara de electroforesis (Mini-Sub® Cell GT, Bio-rad) se cargaron 500 ng/µL de muestra en cada pozo. El gel de agarosa se observó en un transluminador (Gel Doc EZ Imager, Bio-rad).

5.3. cDNA/PCR PUNTO FINAL

A partir del RNA total se sintetizó el cDNA mediante el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™). Para realizar el ensayo se utilizaron los siguientes reactivos: 2 µL de 10X RT Buffer, 0.8 µL 25X dNTP mix (100 mM), 10X RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe Reverse Transcriptase, 4.2 µL de Agua libre de Nucleasas. La reacción fue realizada con 100 ng de RNA total y se agregó agua libre de RNasas para hacer un volumen final de 10 µL. La mezcla fue incubada a 25°C por 10 min, luego a 37°C por 120 min y finalmente a 85°C por 5 min.

El producto del cDNA se utilizó para el ensayo de PCR en punto final usando el equipo Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). El gen constitutivo ACTB (207 pb) se analizó mediante el kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Los primers utilizados contenían las siguientes secuencias Forward (F): 5'CACCCGCGAGTACAACCTTC'3 y Reverse (R): 5'CCCATACCCACCATCACACC'3 (Instituto de Biotecnología, UNAM). Para realizar el ensayo se utilizaron los siguientes reactivos: 10 µL Master mix, 0.3 µL

primer ACTB F, 0.3 μ L de primer ACTB R, 8.4 μ L de Agua libre de nucleasas y 1 μ L de cDNA. Cada PCR fue incubada por 3 min a 95°C para la activación enzimática de un ciclo, después se incubó a 95°C por 30s para desnaturalizar, se extendió a 60°C por 30s y la fase de elongación fue a 72°C por 30s, todos los pasos se realizaron por 40 ciclos. Finalmente se incubó a 72°C por 10 min.

Para evaluar la integridad y la presencia del gen ACTB en los IPM se realizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa y TBE 0.5x al 1%. Mediante una cámara de electroforesis (Mini-Sub® Cell GT, Bio-rad) se cargaron 5 μ L de muestra en cada pozo del producto de la PCR. El gel de agarosa se observó en un transluminador (Gel Doc EZ Imager, Bio-rad). El marcador de peso molecular utilizado fue CSL-MDNA-1Kb DNA Ladder RTU (Cleavers scientific).

5.4. RT-qPCR

Los miRNAs miR-144-3p, miR-23b-3p y miR-381-3p, fueron elegidos de acuerdo con los genes diferencialmente expresados en el trabajo realizado por Pozhitkov [32]. Se seleccionaron los genes desregulados en el proceso de inflamación y apoptosis, con esta lista, se buscaron aquellos miRNAs que pudieran regular la expresión de estos genes empleando la base de datos miRDB (<http://mirdb.org/>). Se seleccionaron para ser analizados con PCR en tiempo real, los miRNAs miR-144-3p, miR-23b-3p y miR-381-3p que regulan BCL6, PROK2 e IL15RA, respectivamente, y que también se ha reportado participan en la inflamación y apoptosis [41, 59, 60].

A partir del RNA total de las muestras musculares, se sintetizó el cDNA para cuantificar los miRNAs mediante el kit TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis (Applied Biosystems). Este kit realiza la reacción de poliadeninación y la ligación de los adaptadores previos a la síntesis del cDNA de los miRNAs. Para la síntesis del cDNA se añadieron 1.5 μ L de la mezcla para la reacción de poliadenilación, además se añadió 1 μ L de RNA de la muestra y se dejó en el termociclador a 36°C por 45 min. Para la reacción de ligación, se realizó una mezcla de ligación del cual se añadieron 5 μ L al producto de la poliadenilación y se dejó a 16°C por 60 min en el termociclador. Posteriormente, se realizó la transcripción reversa, por

lo que se realizó una mezcla nueva y se añadieron 7.5 μ L al producto final de la ligación, esta mezcla se dejó incubar a 42°C por 15 min. Finalmente, se realizó una pre-amplificación, donde se realizó una mezcla de pre-amplificación y en un nuevo tubo se añadió 22.5 μ L de la mezcla y 2.5 del producto de la transcripción reversa. Se dejó incubar en un termociclador por 40 ciclos con las siguientes temperaturas: 95°C por 5 min para la activación enzimática, 95°C por 3 s para la desnaturalización, 60°C por 30 s para la extensión y 99°C por 10 s para detener de la reacción. Todas las reacciones se realizaron con base en el protocolo del fabricante. El cambio en la acumulación de miR-144-3p (rno481325_mir), miR-23b-3p (rno478602_mir) y miR-381-3p (rno481460_mir), se evaluó con el kit TaqMan® Advanced miRNA Assays. El miR-361-5p (rno481127_mir) se utilizó como control interno, ya que se ha reportado que su expresión es estable en condiciones extremas, como el cáncer [61]. La cuantificación de miRNAs se realizó en un sistema de PCR en tiempo real StepOne™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) Utilizando 10 ng de cDNA total, 0.5 μ l del de primer TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X) y 5 μ l de TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X), en un volumen total de 7.5 μ l. Cada RT-qPCR fue incubada por 20 s a 95°C para la activación enzimática de un ciclo, después se incubó a 95°C por 3 s para desnaturalizar y se extendió a 60°C por 30 s, ambos pasos por 40 ciclos. El umbral de CT promedio calculado para cada muestra se usó para cuantificar relativamente la expresión de los miRNAs usando el método 2^{- $\Delta\Delta$ CT} expresado como Fold-Change (FC) [62].

5.5 PREDICCIÓN DE GENES BLANCOS DE miR-23B-3P Y miR-381-3P.

Los genes blanco de los miRNAs miR-144-3p, miR-23b-3p y miR381-3p se identificaron mediante un trabajo *in silico*, utilizando varias bases de datos bioinformáticas que incluían objetivos predichos y validados experimentalmente. Las bases para la predicción de blancos fueron: DIANA microT-CDS [63,64], EIMMo (<http://www.mirz.unibas.ch/EIMMo/>), MicroCosm (<https://omictools.com/microcosm-targets-tool>), miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/getDownloads.do>), miRDB (<http://mirdb.org/>),

PicTar (<https://pictar.mdc-berlin.de/>), PITA (Se utilizaron Segal Lab of Computational Biology, https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html) y TargetScanHuman (http://www.targetscan.org/vert_72/). Las bases de datos para los objetivos validados fueron: miRecords (<http://c1 accurascience.com/miRecords/>), miRTarBase [65] y TarBase [66]. Para cada miRNA, se seleccionaron aquellos genes diana que estaban presentes en al menos tres o más bases de datos. Para identificar las vías biológicas en las que participan los miRNA, estas listas de objetivos de genes se analizaron adicionalmente con el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) del kit de herramientas de análisis de genes SeT basado en WEB (WebGestalt, <http://www.webgestalt.org/>). Solo se consideraron aquellas vías biológicas con un False Discovery Rate (FDR) inferior a 0,05.

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico se comparó de forma general a través de la prueba kruskal-wallis (Kruskal Wallis test) y por pares utilizando la prueba de U Mann-Whitney (Pairwise comparation using U Mann Whitney test), el Fold change de cada miRNA (mir-381-3p, miR-23b-3p y miR-144-3p) del tiempo control (0 h) con los distintos lapsos del IPM (3 h, 6 h, 12 h y 24 h). Subsecuentemente, se realizó una exploración por medio de un Análisis de Correspondencia Múltiple (multiple correspondence analysis) de los comportamientos de presencia (1) y ausencia (0), en los cambios morfológicos post-mortem de las 25 ratas estudiadas a través tiempo.

Aunado a esto se observó la dependencia (Pearson's Chi-squared test) y asociación (Cochran-Armitage test) de los tiempos (Control e Intervalos Post-mortem 3, 6, 12 y 24 h), con los cambios morfológicos post-mortem (presencia y ausencia), y se determinó la contribución de estos. Es importante mencionar que los datos fueron analizados con el programa estadístico R project (<https://www.r-project.org/>).

VII. RESULTADOS

6.1. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA INTERNA Y EXTERNA.

Las condiciones empleadas permitieron evaluar los cambios físicos post-mortem en nuestro modelo murino. Así, los cambios físicos internos y externos en las ratas se comenzaron a observar a partir de las 3 h de IPM.

Los cambios físicos más notables fue el *algor mortis* (AM) que como se muestra en la Figura 2 presentó un decaimiento conforme aumentó el IPM. A partir de las 3 h se presentó una disminución de temperatura con un promedio de 5.8°C y fue superior en comparación a los otros intervalos. Posteriormente, el promedio del decaimiento de temperatura fue de 0.6 de 3 a 6 h, 1.3°C de 6 a 12 h y finalmente de 1.1°C de las 12 a las 24 h.

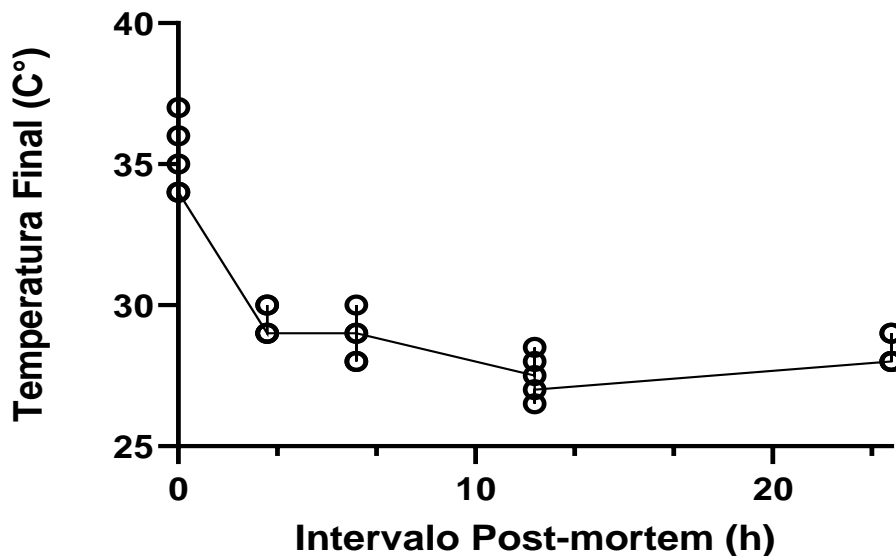


Figura 2. Promedio por grupo del cambio en la temperatura rectal de las ratas Wistar en diferentes Intervalos Post-Mortem.

En la tabla 1 se muestran los cambios morfológicos internos y externos a diferentes IPM que se evaluaron en las 25 ratas. Los cambios físicos externos evaluados incluyeron *algor mortis* (AM), *livor mortis* (LM), *rigor mortis* superior

(RMU), *rigor mortis* inferior (RML), desecación (DR), edema generalizado (ED), pérdida de cabello (HL), coloración verde abdominal (AGD) y distensión abdominal (AD). Todos, excepto RML, ED y AGD, aparecieron después de las primeras 3 horas de PMI. Por otro lado, se observó la AGD hasta las 12 h-IPM. En el caso del rigor mortis, la RMU y la RML solo se observaron de 3 a 6 h-IPM y de 6 a 12 h-IPM, respectivamente.

Tabla 1. Porcentaje de los cambios morfológicos internos y externos a través de diferentes IPM.

Cambios morfológicos	Presencia (%)				
	0 h.	3 h.	6 h.	12 h.	24 h.
EXTERNOS					
<i>Algor mortis</i> (AM)	0	100	100	100	100
<i>Livor mortis</i> (LM)	0	100	100	100	100
<i>Rigor mortis</i> superior (RMU)	0	100	100	0	0
<i>Rigor mortis</i> inferior (RML)	0	0	100	100	0
Desecación (DR)	0	100	100	100	100
Edema generalizado (ED)	0	0	100	100	100
Pérdida de pelo (HL)	0	100	100	100	100
Coloración verde abdominal (AGD)	0	0	0	40	100
Distensión abdominal (AD)	0	100	100	100	100
INTERNOS					
Licuefacción cerebral (BL)	0	40	60	100	100
Edema cerebral (CE)	0	20	100	100	100
Descoloración del hígado (DL)	0	60	80	100	100
Pérdida de consistencia en hígado (LLC)	0	20	60	80	100
Descoloración del corazón (DH)	0	100	100	100	100
<i>Livor mortis</i> muscular (LMM)	0	60	60	100	100
Hinchazón del intestino (SI)	0	20	100	100	100
Ascitis (AS)	0	0	0	0	60
Pérdida de consistencia muscular (LMC)	0	0	0	0	80

n= 25 ratas Wistar (200g +/- 10g)

Para evaluar los cambios internos, todos los animales fueron disectados para observar las siguientes características macroscópicas: licuefacción cerebral (BL),

edema cerebral (BE), decoloración del hígado (DL), pérdida de la consistencia del hígado (LLC), decoloración del corazón (DH), livor mortis muscular (LMM), hinchazón intestinal (BS), ascitis (AS) y pérdida de consistencia muscular (LMC). Como las características externas, todos estos cambios, excepto AS y LMC, se observaron gradualmente después de 3 h-IPM. Las únicas dos características que estaban presentes en todas las ratas y en todos los IPM después de 3 h-IPM fueron DH y LMM. El resto de las características aparecieron gradualmente hasta que estuvieron completamente presentes en todos los animales a las 24 h-PMI. Curiosamente, AS y LMC aparecieron hasta 24 h-PMI y estuvieron presentes en el 60 y 80% de los animales analizados, respectivamente. En el anexo 1 se ejemplifican los principales cambios morfológicos en las ratas, así como algunos cambios que aumentaron gradualmente a través del tiempo. Estos cambios morfológicos fueron evaluados en un Análisis de Correspondencia Múltiple (MCA), para ver cómo se agrupan estas características a través de los PMI analizados.

En la figura 3a se muestra la presencia (1) y ausencia (0) de todos los cambios morfológicos y el IPM por individuo. El gráfico de MCA pudo capturar al menos el 74,2% de los datos y, como era de esperar, las características morfológicas del 0 h-IPM y el 24 h-IPM se ubicaron uno frente al otro. Además, en la figura 3b se muestra la separación en tres grupos, porque compartían algunas características morfológicas entre ellos. El primer grupo incluyó el 0 y 3 h-PMI, el segundo, el 6 y 12 h-PMI, y el tercero, el 24 h-PMI. El grupo I es consistente con los pocos cambios morfológicos presentes dentro de las primeras 3 h-IPM, mientras que en el grupo III es donde se han establecido todas las características físicas tempranas de IPM. Sin embargo, en el grupo II, había características que estaban presentes o ausentes en ambos, el 6 y 12 h-PMI que no permitieron diferenciarlas en el MCA. Estos datos sugieren que la estimación de IPM usando cambios morfológicos podría ser más precisa entre 0 a 3 h-PMI y a las 24 h-PMI de la muerte.

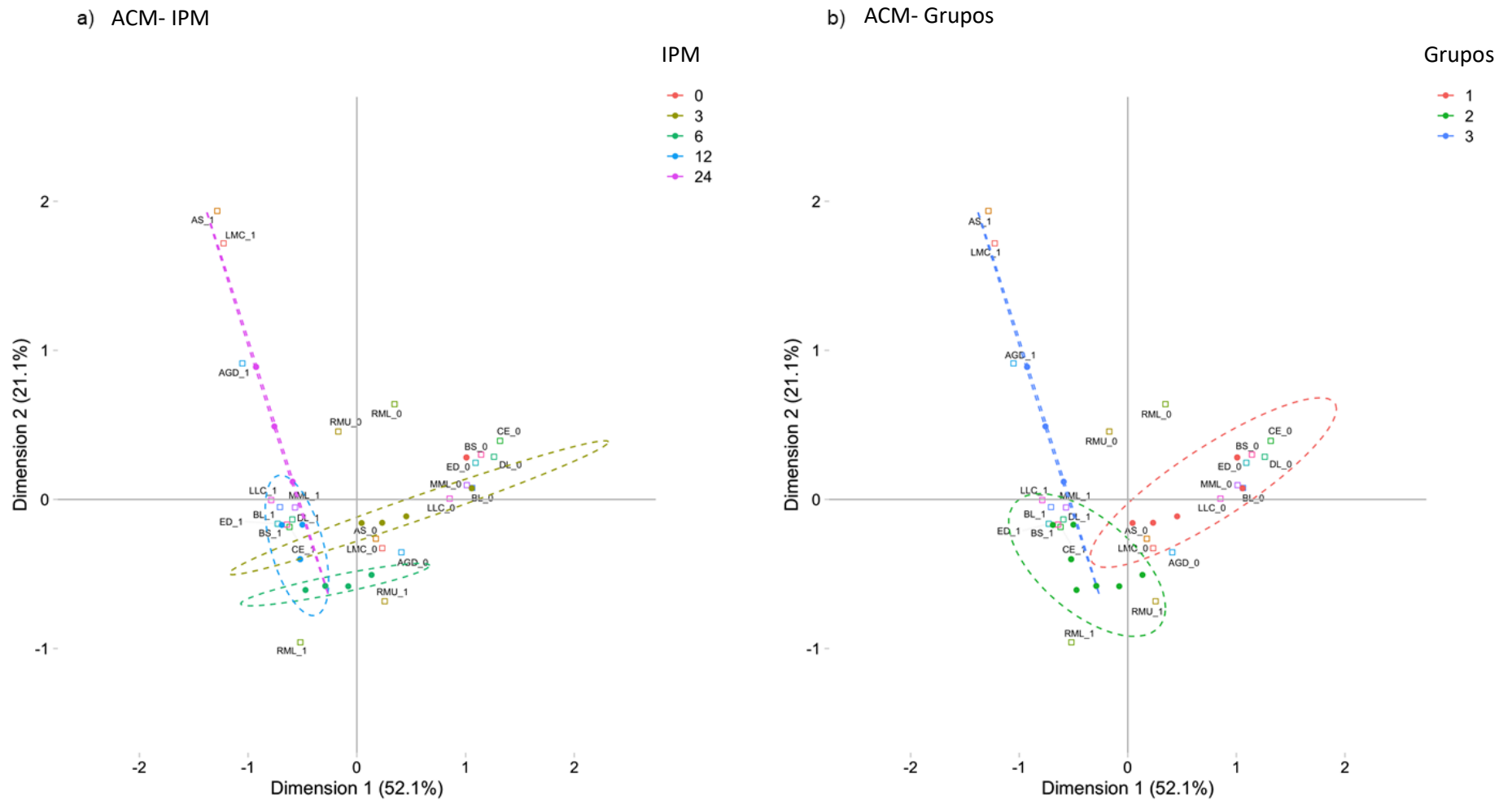


Figura 3. Análisis de correspondencia múltiple entre diferentes intervalos post-mortem con la presencia de cambios morfológicos en ratas. Representación de los diferentes IPM y sus cambios morfológicos en dos dimensiones, los cuales poseen la mayor variabilidad acumulativa de todos los cambios morfológicos que se utilizaron. Los significados de cada abreviatura se muestran en la Tabla 1. Cada elemento en las figuras representa: • individuos (ratas), □ presencia de cambios morfológicos (0 ausencia y 1 presencia), y las elipses muestran las distribuciones individuales sobre los IPM

6.2. ANÁLISIS DEL RNA TOTAL

La extracción de RNA se realizó a partir del tejido muscular de las ratas de todos los tiempos y se cuantificó para obtener su concentración mediante sus respectivas absorbencias:

Tabla 2. Concentración y relación de la absorbancia 260/280 y 260/230 obtenidas por muestra de tejido de IPM

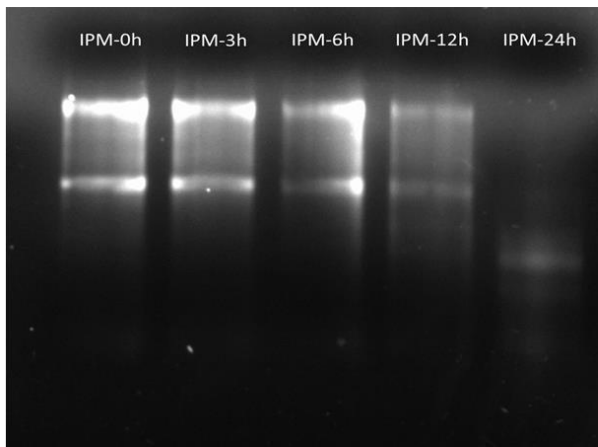
IPM	Muestra	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
0 horas	M-1	287	1.9	1.73
0 horas	M-2	303.5	1.92	0.87
0 horas	M-3	565	1.91	2.46
0 horas	M-4	181.7	1.81	1.85
0 horas	M-5	176.8	1.77	2.13
3 horas	M-6	372	1.9	1.55
3 horas	M-7	286.3	1.87	1.89
3 horas	M-8	515	1.87	2.09
3 horas	M-9	159.1	1.83	1.45
3 horas	M-10	428.9	1.87	2.20
6 horas	M-11	346.3	1.88	1.88
6 horas	M-12	554.3	1.89	2.05
6 horas	M-13	268	1.89	1.28
6 horas	M-14	273	1.88	1.52
6 horas	M-15	387.2	1.9	1.45
12 horas	M-16	308	1.89	1.09
12 horas	M-17	295	1.87	1.28
12 horas	M-18	543	1.88	2.10
12 horas	M-19	215.1	1.82	1.86
12 horas	M-20	647.8	1.9	2.14
24 horas	M-21	534	1.86	2.02
24 horas	M-22	188	1.83	1.73
24 horas	M-23	150.4	1.78	1.9
24 horas	M-24	645	1.88	2.3
24 horas	M-25	144.2	1.77	1.9

También, se evaluó cualitativamente el RNA extraído, y como se observa en la figura 4a, el RNA presenta una ligera degradación respecto al control en los IPM de 6 y 12 h. Sin embargo, las bandas 28S y 18S aún se conservan a pesar de la degradación. En el IPM de 24 h el RNA se observa más degradado que en los otros IPM y en el control, es evidente un barrido y no se conservan las bandas anteriormente mencionadas.

Así mismo, se evaluó la expresión del gen constitutivo ACTB para determinar la presencia de transcritos en las células de tejido muscular a pesar del IPM y la degradación del RNA. Como se muestra en la Figura 4b, se logró observar la

expresión del gen constitutivo en todas las muestras de RNA de todos los IPM. Sin embargo, a las 24 h se observó una ligera disminución de la fluorescencia de la banda en comparación con el control, a pesar de tener el mismo volumen del producto de PCR. Por lo tanto, a pesar de la calidad del RNA a las 24 h aún es posible encontrar transcritos hasta este IPM.

a) RNA



b) ACTB

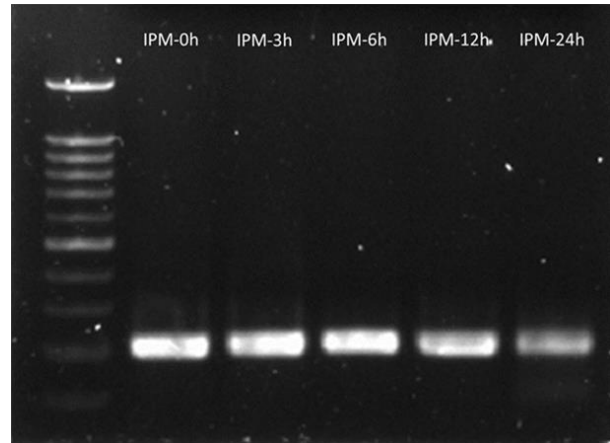


Figura 4. Análisis cualitativo del RNA y la expresión del gen ACTB a diferentes IPM A) Evaluación cualitativa del RNA total de músculo de rata en diferentes IPM. Presencia de las bandas 28S y 18S a las 0, 3, 6 y 12 horas y un barrido de RNA a las 24 h. b) Expresión del gen constitutivo ACTB en músculo de rata a diferentes IPM. Análisis cualitativo del gen ACTB a las 0h, 3h, 6h, 12h y 24h.

6.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE miR- 23b-3p, miR-381-3p y miR-144-3p.

Para determinar la cantidad del transcrito de de miR-381-3p, miR-23b-3p y miR-144-3p en músculo de rata de todos los IPM se realizó un ensayo de RT-qPCR. El FC se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando miR-361-5p como control interno y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba Mann-Whitney. En la figura 4a, se observa un aumento en la cantidad del miR-381-3p en el grupo de las 24 h-IPM en comparación con el control 0 h-IPM (FC = 1.02 vs. FC = 1.96; $p < 0.005$, prueba de Mann U Whitney; Figura 5a). Cuando se analizó el FC de miR-381-3p a

través de los diferentes IPM, la acumulación de este miRNA tenía una curva en forma de J (ver Figura 5a). Primero, dentro de las 3 h-IPM la expresión de miR-381-3p disminuyó de 1.02 a 0.73 respecto al control y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$, prueba de Mann U Whitney; Figura 5a). De hecho, la diferencia en el miR-381-3p fue más evidente comparando el 3 h-IPM con el 24 h-IPM ($p < 0.005$, prueba de Mann U Whitney). Sin embargo, después de 3 h-IPM, la cantidad de este miRNA aumentó gradualmente de 6 h-IPM a 24 h-IPM (ver Figura 5a). La diferencia en la cantidad entre las 3 h-IPM y 12 h-IPM fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$, prueba de Mann U Whitney). A diferencia del miR-381-3p, la cantidad del miR-23b-3p disminuyó a medida que el IPM aumentaba hasta las 24 h. En la figura 5b se muestra la cantidad del transcrito de miR-23b-3p, la cual disminuyó a las 24 h-IPM en comparación con 0 h-IPM, y esta diferencia fue estadísticamente significativa (FC = 1,22 frente a FC = 0,13; $p < 0,01$, prueba de Mann U Whitney; Figura 5b). Al igual que con las 0 h-IPM, hubo diferencias estadísticamente significativas comparando 3 h vs. 24 h-IPM ($p < 0.005$, prueba de Mann U Whitney), 6 h-IPM vs. 24 h-IPM ($p < 0.005$, Mann Prueba de U Whitney) y 12 h-IPM vs. 24 h-IPM ($p < 0.005$, prueba de Mann U Whitney).

Finalmente, en la figura 5c se muestra la cantidad del transcrito de miR-114-3p, que, aunque tuvo una disminución del FC de 0 h-IPM a 6 h-IPM, estas diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$, prueba de Mann U Whitney; ver Figura 5c). De hecho, el FC se mantuvo sin cambios en los siguientes dos IPM. Estos resultados sugieren que existe un cambio en la cantidad de transcrito de miR-381-3p y miR-23b-3p a medida que aumenta el tiempo del IPM en ratas.

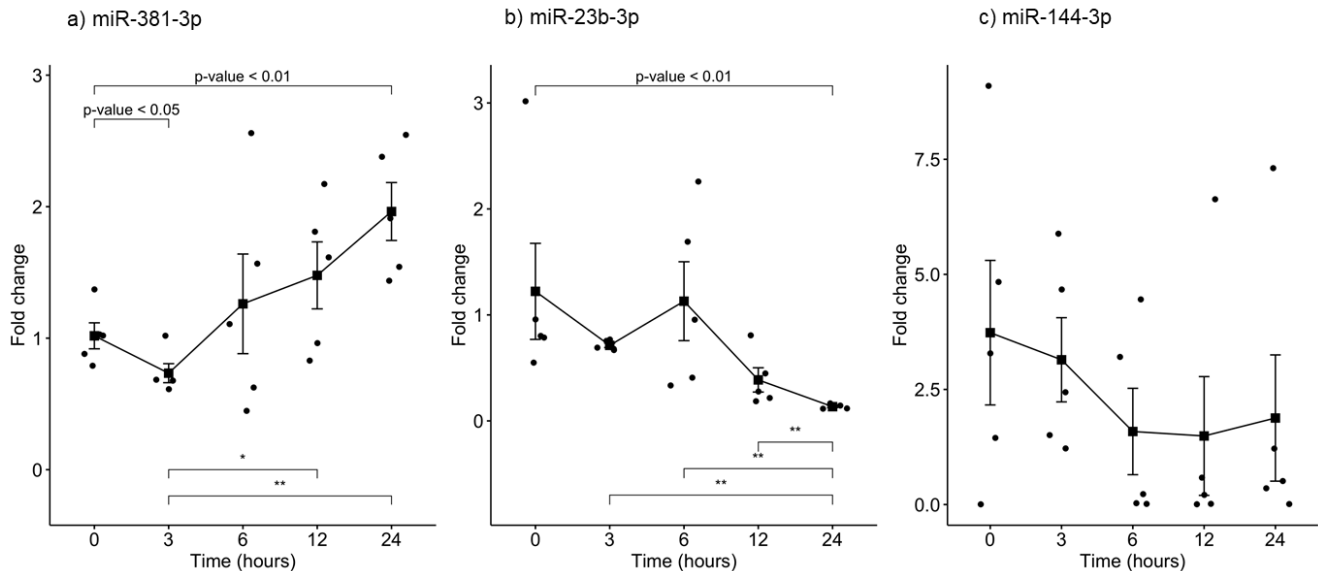


Figura 5. Análisis del cambio en la acumulación de miRNAs miR-381-3p, miR-23b-3p y miR-144-3p en músculo esquelético de rata a lo largo del intervalo post mortem temprano diferente. El Fold Change (FC) de miRNAs a). miR-381-3p b). miR-23b-3p y c). miR-144-3p. Se analizó miR-144-3p en músculo esquelético de ratas a las 0, 3, 6, 12 y 24 horas de PMI usando RT-qPCR cuantitativa. El cambio de pliegue de cada miRNA se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ 651 utilizando miR-361-5p como control interno. Los cuadrados negros representan la media del FC de cada grupo, el bigote corresponde al intervalo de confianza del 95% y los puntos son el FC nervioso de cada muestra. Las comparaciones entre el PMI se realizaron con la prueba de Mann U-Whitney. * valor $p < 0.05$, ** valor $p < 0.01$

6.4. ANALISIS DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS DE miR-381-3p Y miR-23-3p

Usando la herramienta bioinformática WebGestalt identificamos los genes blanco de miR-381-3p y miR-23b-3p y encontramos que un total de 2122 y 2076 genes estaban regulados por miR-381-3p y miR-23b-3p, respectivamente (Anexo 2). Con cada conjunto de genes se realizó un análisis de enriquecimiento de Ontología Genética (Gene Ontology enrichment análisis, FDR < 0.005), para encontrar el proceso biológico principal en el que participan. En la figura 6a se muestran los procesos biológicos de los genes silenciados por miR-381-3p. Se encontró que un total de seis procesos biológicos estaban regulados por este miRNA, de los

cuales, cuatro están relacionados con el procesamiento, la transcripción, síntesis y metabolismo del RNA. El resto de los procesos están involucrados con la regulación positiva de la expresión génica. Por otro lado, en la figura 6b se observan un total de nueve procesos biológicos asociados con miR-23b-3p, que fueron más heterogéneos en comparación con miR-381-3p. Los dos procesos biológicos más enriquecidos fueron los relacionados con la respuesta a la hipoxia y los niveles de oxígeno. Además, hubo procesos relacionados con el desarrollo del sistema nervioso central. También, otras vías celulares complejas estaban implicadas con este miRNA, como la regulación positiva de la señalización, la fosforilación y la ubicación celular. Aunque ninguno de los procesos biológicos en los que participó este miRNA está relacionado con la apoptosis y la inflamación, parece que su función en IPM estaría relacionada con el proceso de descomposición del cuerpo.

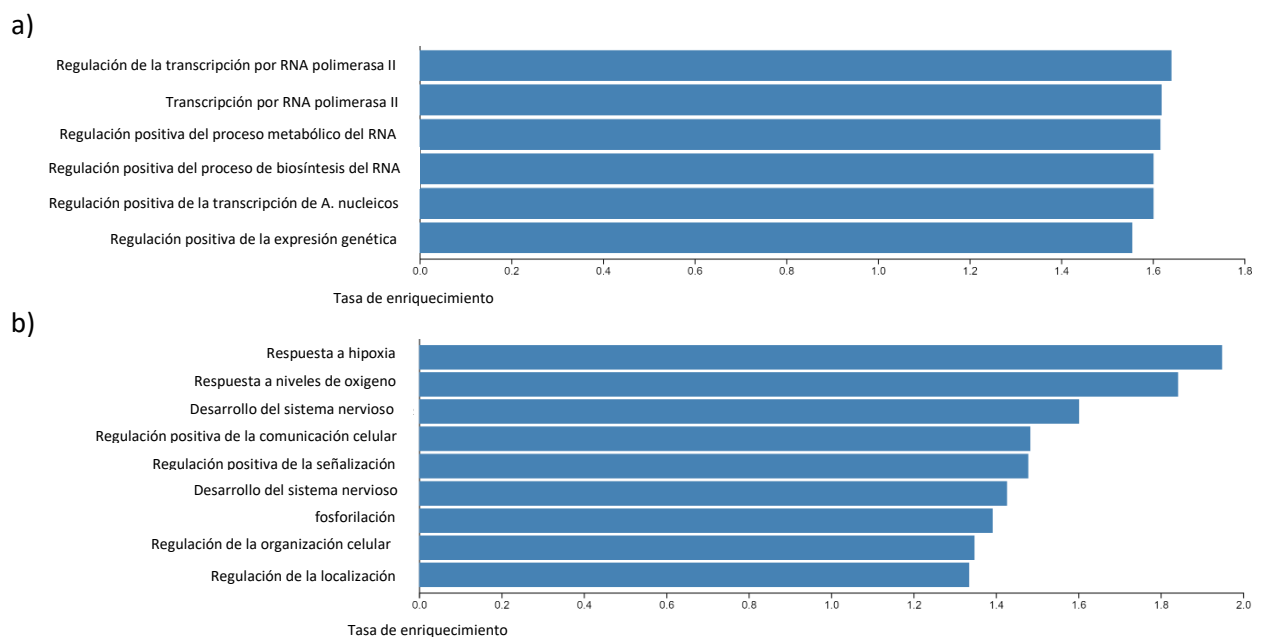


Figura 6. Análisis de enriquecimiento ontológico genético de los genes blanco de los miRNAs a) miR-381-3p y b) miR-23b-3p. El número en cada barra indica el número de genes enriquecidos anotados con el término correspondiente de ontología génica con una tasa de descubrimiento falso (FDR) inferior a 0,05.

VII. DISCUSIÓN

El IPM es uno de los aspectos médico-legales más importantes en las investigaciones judiciales, por lo tanto, la precisión de la determinación de este intervalo hace que las investigaciones penales sean más eficientes. En este estudio se realizó la estimación del IPM a través de un modelo murino mediante la expresión de los miRNAs miR-23b-3p, miR-144-3p y miR-381-3p en el músculo esquelético y mediante la presencia y la ausencia de los cambios post mortem. También, se analizaron los procesos biológicos en los que participan los genes blanco de miR-23b-3p y miR-381-3p por lo que, de esta manera podremos entender mejor el proceso de autólisis. Por lo tanto, la comprensión de este tipo de muerte celular es importante para relacionar la expresión de elementos celulares que pueden fungir como biomarcadores y el IPM.

En este estudio se propuso un modelo murino para estimar el IPM, analizando los cambios post-mortem en los diferentes intervalos y condiciones ambientales homogéneas. A partir de las 3 h-IPM se observaron los primeros cambios post-mortem y la mayor parte de ellos aumentaron con el IPM. Anteriormente se han descrito algunos cambios morfológicos post-mortem en modelos murinos [67,68]. Sin embargo, los autores solo analizaron los cambios encontrados a partir de las 24 h-IPM, los cuales coinciden con cambios descritos en este trabajo a las 24 h-IPM. Algunos de los cambios observados que coinciden son *Livor mortis*, edema, distensión abdominal, licuefacción. Asimismo, la cascada de cambios morfológicos post-mortem que pueden presentarse en humanos [5], también se observó en las ratas. Estos cambios se observaron en intervalos de tiempo más cortos en comparación que en humanos, lo cual es lo apropiado para un modelo biológico. Con base en lo anterior, el modelo murino empleado en este trabajo puede utilizarse como un buen modelo para estimar el IPM, con los mismos cambios físicos que en humanos.

En este estudio, también se describieron los cambios morfológicos internos y externos post mortem que se presentan en el modelo murino. Conforme aumentó el IPM, fue posible observar diversos cambios, entre los más importantes fue el

AM, ya que actualmente es el utilizado para la estimación del IPM con fines forenses [26]. Actualmente, no hay algún estudio que reporte el descenso de temperatura en el IPM temprano, la mayoría se centran el IPM tardío. Sin embargo, Kuribayashi y colaboradores [69], reportaron un descenso de temperatura de 7.1° y 8.1°C las dos primeras horas en un modelo de ratas SD, con una temperatura ambiente de entre 20.8° a 18.4°C. En humanos sucede algo similar, la forma de la curva es tipo sigmoide, con un descenso mayor de temperatura seguida de una fase de plato [6]. Al igual que en nuestro modelo, existe un decaimiento de la temperatura en los humanos, este es menor, justo antes de llegar a la fase de plato, donde existe una disminución de temperatura cada vez menor hasta llegar a igualarse con el ambiente. Este modelo logra representar el AM en un menor tiempo que en humanos y por lo tanto es un buen modelo a escala de los cambios post-mortem en el cuerpo.

Además del AM, a partir de las 3h se presentaron otros cambios morfológicos externos en las ratas, los cuales fueron LM, ED, DR, HL, AGD y AD. En humanos, el LM se presenta durante las fases iniciales. Comienza a aparecer como parches en las partes bajas del cadáver dentro de las primeras 3 h después de la muerte. Las manchas aumentan de tamaño y se extienden por todas las regiones bajas del cuerpo de las 4 a las 6 h y se desarrollan completamente de las 6 a las 8 h y su coloración dependerá del tipo de muerte [70–73]. Además de estos cambios externos, también se presentaron internamente en músculo (LMM).

En nuestro modelo de estudio la DR se observó en el escroto de las ratas, lo que concuerda con la desecación que se ha observado principalmente en tejidos delgados como escroto, nariz, labios, orejas, entre otros [74].

El HL se asocia la descomposición temprana, en humanos está presente a partir de las 8 h-IPM [74,75]. En las ratas se presentó a partir de las 3 h-IPM, esto probablemente por la cantidad de pelo que tienen, asimismo, el pelo se caía al tacto en las primeras horas de IPM. El ED, AGD, AD e internamente BS son el resultado de la acumulación de gases durante la autólisis que causa distensión del torso y representa el comienzo de la putrefacción mediante la acción de

microorganismos [76]. En humanos estos cambios morfológicos inician aproximadamente a las 24h-IPM y termina aproximadamente a los 11 días de IPM [75,77].

El *rigor mortis* depende de la temperatura donde, la presencia de sustancias químicas ante-mortem y el tamaño del músculo en el cadáver. Generalmente inicia en la parte superior del cuerpo, en músculos de la cara y finalmente las extremidades inferiores [78]. Al igual que en nuestro modelo que inició en el hemicuerpo superior y posteriormente en el inferior hasta disolverse. El *rigor mortis* desaparece en el mismo orden en que aparece. Krompecher [79] realizó un estudio en 54 ratas albinas de la misma edad donde medía la fuerza necesaria para romper el *rigor mortis* en las articulaciones de los miembros inferiores a 24°C. Los autores reportaron el desarrollo máximo del *rigor mortis* a las 6 h de IPM y a las 21 h de IPM el *rigor mortis* se disolvió por completo del cuerpo de la rata. Estos resultados concuerdan con lo reportado en el trabajo, donde a las 6 horas la rigidez se presentaba en todo el cuerpo y a las 24 h estaba completamente disuelto.

El cambio interno macroscópico que presentan las ratas en sus órganos como BL, CE, DL, LLC, DH, AS y LMC, pueden deberse a la autólisis celular y al proceso de putrefacción mediada por el microbiota de la rata. La autólisis se describe como el primer cambio identificable en un cadáver, y es la auto-digestión de las células a través de la acción de sus propias enzimas [5,21]. Este proceso ocurre principalmente en las células metabólicamente más activas y se cree que se desencadena por la disminución del pH intracelular como resultado de la anoxia [80]. Dentro los órganos metabólicamente más activos se encuentran el hígado y el cerebro, que en nuestro modelo fueron de los órganos con mayor grado de descomposición. Las proteínas de los tejidos neuronales y epiteliales suelen ser las primeras en ser destruidas, incluida la membrana del revestimiento del tracto gastrointestinal, mientras que las que son más resistentes a la descomposición incluyen a la epidermis, el colágeno y las proteínas musculares [81]. Por lo tanto, el tejido muscular inició el proceso de descomposición después que los otros

tejidos. En humanos se ha reportado licuefacción en el 85% del cerebro a los 3 días de IPM, dependiendo de las condiciones ambientales, el tipo de muerte y las condiciones pre-mortem [82].

La degradación del RNA fue mayor a las 24h-IPM, esto concuerda con el cambio morfológico LMC, que también se observó a las 24h. La degradación del tejido y RNA podría deberse al proceso autolítico, donde se liberan enzimas ribonucleasas y proteolíticas, así como la influencia de otros factores ambientales como la temperatura [12,29,83,84].

En el presente estudio también se reportó la expresión del gen constitutivo ACTB, durante todos los IPM, a pesar de la degradación del RNA a las 24 h. El amplicón de este gen fue de 209 pares de bases, por lo tanto, es probable que esto ayudara a la conservación del fragmento y evitara la degradación. Sin embargo, la presencia de este amplicón podría hablarnos de transcritos que pudieran ser funcionales. El gen ACTB codifica para una proteína estructural del citoesqueleto abundante y altamente conservada, participa en la división celular, el desarrollo embrionario, la respuesta inmune y la expresión génica [84]. Se han reportado la expresión de diversos genes a través de diferentes IPM en diferentes tipos de tejidos en humano y rata [33,58,86,87]. Por lo tanto, el modelo murino propuesto en este trabajo es funcional para evaluar la expresión de los miRNAs miR-144-3p, miR-23b-3p y miR-381-3p en músculo esquelético en los IPM propuestos.

En el análisis de la cantidad de los miRNAs encontramos un cambio en las concentraciones de miR-381-3p y miR-23b-3p en el tejido del músculo esquelético de ratas a diferentes IPM. La cantidad del miR-23b-3p disminuyó a partir de 0 a 24 h-PMI, en contraste con la cantidad del transcrito del miR-381-3p que aumentó, mostrando una curva en forma de J a medida que aumentaba el IPM. Estos dos miRNAs regulan la expresión de genes que participan en procesos como la hipoxia o la cantidad de oxígeno y la transcripción de RNA. Diversos estudios han descrito previamente la expresión de varios miRNA en diversos tejidos, a través del IPM en humanos y en ratas [56,88]. Como se esperaba, debido a su tamaño pequeño, pueden tolerar la degradación ya que se pueden encontrar hasta en IPM

tardío [26]. Sin embargo, actualmente dichos estudios se han centrado principalmente en encontrar genes constitutivos (housekeeping) para el cálculo del IPM. Por ejemplo, la expresión génica de miR-9 y miR-125b en bazo de ratas apenas fluctúa a través de los diferentes PMI [57]. También se han reportado cambios en la expresión de algunos miRNAs dentro de las primeras 24 h de IPM [55]. En el cerebro de la rata, se ha encontrado que la expresión génica de miR-16 disminuyó ligeramente de 0 a 24 h-PMI [89]. Por el contrario, miR-124a, miR-205 y miR-21 aumentaron su concentración dentro de las primeras 24 h-IPM en el cerebro y la piel [89, 90]. Este estudio sugiere que los miRNAs podrían participar activamente en el proceso de descomposición, en lugar de ser moléculas inertes que resisten en gran medida la degradación por enzimas o factores ambientales. Asimismo, la evidencia de diversos estudios sugiere que la autólisis podría ser más que la liberación enzimática y la degradación proteómica. Este proceso podría ser un proceso más complejo entre la supervivencia y las señales pro-apoptóticas [34, 91].

También, es importante mencionar que el aumento en la cantidad de estos miRNAs no quiere decir que realmente sean funcionales dentro de la célula o se estén expresando. Para poder determinar su funcionalidad son necesarios otros estudios, sin embargo, el alcance de este trabajo solo nos permite saber la cuantificación relativa de los miRNAs. Así mismo, a pesar de dichas limitaciones, se reportaron cambios en las cantidades de los transcrito en miR23b-3p y miR-381-3p. Es la primera vez que se reporta el cambio en la cantidad del transcrito de miRNAs a través de los IPM. Por lo tanto, este trabajo podría dar las bases para que posteriormente se analice la expresión de miR-381-3p, que fue el que mayor cambio presentó respecto al control, en otro tipo de modelos, incluso en humanos y de esta forma poder estimar el IPM.

Se sabe que existe actividad transcripcional de algunos genes que podría durar varios días [33, 91, 92], por lo tanto, se espera un aumento en genes relacionados con procesos que favorecen la progresión de la descomposición, como la apoptosis [34]. Caso contrario, también se ha reportado una disminución en la

expresión en genes relacionados con la supervivencia celular [92]. En nuestro estudio, aunque la concentración de miR-381-3p disminuyó en las primeras 3 h-IPM, éste aumentó después. El miR-381-3p en humanos ha sido considerado como un supresor tumoral en la próstata y el cáncer de pulmón de células. Por lo tanto, inhibe la proliferación celular, la invasión y la migración a través de la inhibición de la señalización del factor nuclear κ B, además de estar involucrado en la respuesta inflamatoria [93, 94, 95]. Por lo tanto, en nuestro estudio el aumento de la expresión de este miRNA podría ser un mecanismo para promover la apoptosis relacionada por la hipoxia y además participar en el proceso inflamatorio.

También, se sabe que miR-381 regula genes relacionados con la transcripción de RNA y el metabolismo. Por ejemplo, el gen *RNASE2* que es un gen de la familia de las ribonucleasas involucradas en la degradación del RNA, se ha encontrado en varios tejidos y se aumenta su concentración a medida que aumenta el IPM [33]. Además, a principios de IPM en el músculo esquelético, se ha informado una disminución en la expresión génica de genes relacionados con procesos como la regulación de la estabilidad del ARNm o la unión de la cola poli A RNA [91]. Esto sugiere que miR-381-3p podría estar implicado en la regulación de la estabilidad de la transcripción.

A diferencia de miR-381-3p, miR-23b-3p mostró una reducción gradual en su concentración en todos los IPM analizados. El miR-23b-3p se ha considerado como un oncomiR en varios tipos de cáncer [96,97], debido a que promueve la proliferación celular, mientras que inhibe la fosforilación oxidativa aumentando los niveles de lactato en estas células [98]. La proliferación mediada por miR-23b-3p se debe a la activación de la señalización de TGF- β por inhibición de TGIF1 [99]. Sin embargo, esto sucede en cáncer, donde el metabolismo de la célula es aeróbico [100], por lo tanto, podría ser diferente en nuestro modelo, donde hay carencia de oxígeno. Asimismo, miR-23b-3p regula muchos genes que participan en procesos relacionados con la respuesta a los niveles de oxígeno. La regulación negativa de este miRNA sugiere que podría ser en respuesta a los niveles bajos

de oxígeno, al menos dentro de las primeras 24 h después de la muerte. Se ha reportado en ratones que en las primeras 24 h de IPM, hay un aumento en la cantidad de genes relacionados con la hipoxia como *Degs2* [32]. El gen *Degs2* es un sensor de oxígeno que regula el crecimiento celular, la muerte, la angiogénesis, entre otros procesos [32]. Los resultados del presente estudio sugieren que la sub-expresión de miR-23b-3p a través del IPM, detiene la proliferación celular en las células al comienzo del proceso de autólisis. Además, en el músculo esquelético y el corazón de los humanos, existe una regulación positiva de los genes que participan en la fosforilación oxidativa y otras síntesis de proteínas mitocondriales [101]. Se ha encontrado que la expresión génica de HBA1, que participa en el transporte de oxígeno, aumenta gradualmente en el IPM temprano [33]. Esto sugiere que la respuesta a la hipoxia parece crucial en el IPM con la activación de la glucólisis, entre otras vías, para mantener una homeostasis.

La cantidad del transcrito de miR-381-3p y miR-23b-3p a las 6h de IPM no fueron estadísticamente significativas presentaron mucha dispersión entre los individuos. Curiosamente, estas diferencias también se observaron en las características físicas de las ratas a las 6h-IPM en el Análisis de Correspondencia Múltiple (MCA). Sin embargo, se presentó claramente la separación de los tiempos 0, 3, 12 y 24. Por lo tanto, es posible que la velocidad de descomposición varíe a las 6 h-IPM, lo que da como resultado ratas que aún presentan algunas características del IPM inmediato, lo que dificulta su cálculo.

Asimismo, es importante mencionar que las condiciones de los experimentos se realizaron en un modelo animal mediante el control de las condiciones ambientales, como la temperatura y la humedad, que pueden diferir drásticamente de los escenarios forenses reales. Por lo tanto, es probable que la expresión de los miRNAs y los cambios morfológicos reportados en las ratas puedan variar según las diferentes condiciones ambientales.

VIII. CONCLUSIONES

El modelo murino propuesto para la estimación del IPM es funcional, ya que se lograron apreciar los cambios morfológicos post-mortem presentes en humanos en menor tiempo. Además de identificar los principales cambios en las ratas y relacionar su presencia o ausencia con el IPM.

La integridad del RNA se conservó hasta las 12h-IPM, y se mantuvo la expresión de gen constitutivo ACTB en todos los IPM, incluyendo el intervalo de 24h, donde el RNA presentó un mayor grado de degradación.

Los cambios en la expresión génica durante el IPM de los miRNAs de miR-381-3p y miR-23b-3p podrían funcionar como biomarcadores en la estimación del IPM, ya que su regulación varía con el tiempo.

Con base en nuestros resultados, es probable que los cambios en la expresión génica de miR-381-3p y miR-23b-3p en el músculo estén relacionados con el proceso de autólisis en el intervalo post-mortem temprano en ratas. La expresión de estos miRNAs podría generar cambios en la expresión de diversos genes involucrados en la respuesta a la hipoxia, apoptosis y el metabolismo del RNA en el IPM temprano. Por lo tanto, como en otros estudios, los resultados de este trabajo indican que después de la muerte de un individuo, hay una actividad transcripcional en varios tejidos que podría durar varios días.

IX. APORTACIONES

En el presente trabajo se propone un modelo murino funcional para la estimación del IPM con condiciones controladas, este modelo es fundamental para poder entender el proceso de descomposición a nivel molecular. Debido al control presente en las diversas variables ambientales y las condiciones pre-mortem en los individuos es posible disminuir la cantidad de variables que afecta el proceso de autólisis y la expresión de los genes a través de los IPM. Asimismo, este es el primer trabajo en donde se analiza la expresión de miR-381-3p y miR-23b-3p involucrados en las vías inflamación y apoptosis, las cuales podrían estar relacionadas con la autólisis celular en el IPM temprano. También se analizaron los genes blanco de estos miRNAs y determinar los procesos celulares donde podrían estar participando, con el fin de entender un poco más el proceso de autólisis celular.

X. PERSPECTIVAS

En el presente estudio se analizaron tres miRNAs que posiblemente están involucrados en el proceso de autólisis celular. Sin embargo, se sabe que diversos genes que se están expresando diferencialmente a través del IPM, con base en esto, es preciso determinar si existen miRNAs que también puedan estar participando en este proceso. También, se propone realizar un modelo para demostrar la funcionalidad de miR-381-3p como biomarcador del IPM en ratas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aydin B, Colak B, Balci Y, Demirüstü C. Consistency of postmortem interval estimations of physicians using only postmortem changes of putrefied dead bodies [published correction appears in *Am J Forensic Med Pathol*. 2012 Jun;33(2):183. Aydn, Berna [corrected to Aydin, Berna]; Balc, Yasemin [corrected to Balci, Yasemin]]. *Am J Forensic Med Pathol*. 2010;31(3):243-246. doi:10.1097/PAF.0b013e3181ee01d9
2. Maile AE, Inoue CG, Barksdale LE, Carter DO. Toward a universal equation to estimate postmortem interval. *Forensic Sci Int*. 2017;272:150-153. doi:10.1016/j.forsciint.2017.01.013
3. Lee Goff M. Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. *Exp Appl Acarol*. 2009;49(1-2):21-36. doi:10.1007/s10493-009-9284-9
4. Ceciliason AS, Andersson MG, Lindström A, Sandler H. Quantifying human decomposition in an indoor setting and implications for postmortem interval estimation. *Forensic Sci Int*. 2018;283:180-189. doi:10.1016/j.forsciint.2017.12.026
5. Dix J, Graham M. *Causes of Death Atlas Series: Time of Death, Decomposition and Identification: An Atlas*. Dix J, editor. Florida: CRC Press LLC; 2000.
6. Hubig M, Muggenthaler H, Sinicina I, Mall G. Temperature based forensic death time estimation: The standard model in experimental test. *Leg Med (Tokyo)*. 2015;17(5):381-387. doi:10.1016/j.legalmed.2015.05.005
7. De-Giorgio F, Nardini M, Foti F, et al. A novel method for post-mortem interval estimation based on tissue nano-mechanics. *Int J Legal Med*. 2019;133(4):1133-1139. doi:10.1007/s00414-019-02034-z
8. Anders S, Kunz M, Gehl A, Sehner S, Raupach T, Beck-Bornholdt HP. Estimation of the time since death--reconsidering the re-establishment of

- rigor mortis. *Int J Legal Med.* 2013;127(1):127-130. doi:10.1007/s00414-011-0632-z.
9. Crostack C, Sehner S, Raupach T, Anders S. Re-establishment of rigor mortis: evidence for a considerably longer post-mortem time span. *Int J Legal Med.* 2017;131(4):1039-1042. doi:10.1007/s00414-017-1558-x
 10. Brooks JW. Postmortem Changes in Animal Carcasses and Estimation of the Postmortem Interval. *Vet Pathol.* 2016;53(5):929-940. doi:10.1177/0300985816629720
 11. Ruder TD, Thali MJ, Hatch GM. Essentials of forensic post-mortem MR imaging in adults. *Br J Radiol.* 2014;87(1036):20130567. doi:10.1259/bjr.20130567
 12. Dent BB, Forbes SL, Stuart BH. Review of human decomposition processes in soil. *Environ Geol.* 2004;45(4):576–85. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00254-003-0913-z>
 13. Cocariu EA, Mageriu V, Stăniceanu F, Bastian A, Socoliuc C, Zurac S. Correlations Between the Autolytic Changes and Postmortem Interval in Refrigerated Cadavers. *Rom J Intern Med.* 2016;54(2):105-112. doi:10.1515/rjim-2016-0012.
 14. Filograna L, Thali MJ. Post-mortem CT imaging of the lungs: pathological versus non-pathological findings. *Radiol Med.* 2017;122(12):902-908. doi:10.1007/s11547-017-0802-2
 15. Hau Tc, Hamzah Nh, Lian Hh, Amir Hamzah Spa. Decomposition Process and Post Mortem Changes: Review (Proses Pereputan dan Perubahan Pasca Kematian: Ulasan) *Sains Malaysiana.* 2014;43(12):1873–82. DOI: 10.17576/jsm-2014-4312-08
 16. J. Rich, D. E. Dean and RHP. The Decomposition of Human Remains. En: *Medicine, Forensic Science and Analysis, Forensic Medicine of the Lower Extremity: Human Identification and Trauma of the Thigh, Leg, and Foot.*

2005. p. 422.

17. Zhou C, Byard RW. Factors and processes causing accelerated decomposition in human cadavers - An overview. *J Forensic Leg Med.* 2011;18(1):6-9. doi:10.1016/j.jflm.2010.10.003
18. Matuszewski S. A general approach for postmortem interval based on uniformly distributed and interconnected qualitative indicators. *Int J Legal Med.* 2017;131(3):877-884. doi:10.1007/s00414-016-1520-3
19. Siddhamsetty AK, Verma SK, Kohli A, Verma A, Puri D, Singh A. Exploring time of death from potassium, sodium, chloride, glucose & calcium analysis of postmortem synovial fluid in semi arid climate. *J Forensic Leg Med.* 2014;28:11-14. doi:10.1016/j.jflm.2014.09.004
20. Chandrakanth HV, Kanchan T, Balaraj BM, Virupaksha HS, Chandrashekar TN. Postmortem vitreous chemistry--an evaluation of sodium, potassium and chloride levels in estimation of time since death (during the first 36 h after death). *J Forensic Leg Med.* 2013; 20(4):211-216. doi:10.1016/j.jflm.2012.09.001
21. Tumram NK, Ambade VN, Dongre AP. Thanatochemistry: Study of synovial fluid potassium. *Alexandria J Med.* 2014; 50(4):369–72. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2014.02.005>.
22. Singh D, Prashad R, Parkash C, Bansal YS, Sharma SK, Pandey AN. Linearization of the relationship between serum sodium, potassium concentration, their ratio and time since death in Chandigarh zone of north-west India. *Forensic Sci Int.* 2002; 130(1):1-7. doi:10.1016/s0379-0738(02)00267-0
23. Zilg B, Bernard S, Alkass K, Berg S, Druid H. A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature. *Forensic Sci Int.* 2015; 254:158-166. doi:10.1016/j.forsciint.2015.07.020

24. Madea B, Käferstein H, Hermann N, Sticht G. Hypoxanthine in vitreous humor and cerebrospinal fluid--a marker of postmortem interval and prolonged (vital) hypoxia? Remarks also on hypoxanthine in SIDS. *Forensic Sci Int.* 1994;65(1):19-31. doi:10.1016/0379-0738(94)90296-8
25. Ansari N, Menon SK. Determination of Time since Death using Vitreous Humor Tryptophan. *J Forensic Sci.* 2017;62(5):1351-1356. doi:10.1111/1556-4029.13430
26. Madea B. Methods for determining time of death. *Forensic Sci Med Pathol.* 2016;12(4):451-485. doi:10.1007/s12024-016-9776-y
27. Muñoz Barús JI, Suárez-Peñaranda J, Otero XL, et al. Improved estimation of postmortem interval based on differential behaviour of vitreous potassium and hypoxanthine in death by hanging. *Forensic Sci Int.* 2002;125(1):67-74. doi:10.1016/s0379-0738(01)00616-8.
28. Itani M, Yamamoto Y, Doi Y, Miyaishi S. Quantitative analysis of DNA degradation in the dead body. *Acta Med Okayama.* 2011;65(5):299-306. doi:10.18926/AMO/47011
29. Lv YH, Ma JL, Pan H, et al. RNA degradation as described by a mathematical model for postmortem interval determination. *J Forensic Leg Med.* 2016;44:43-52. doi:10.1016/j.jflm.2016.08.015
30. Inoue H, Kimura A, Tuji T. Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi-quantification study. *Forensic Sci Int.* 2002;130(2-3):127-132. doi:10.1016/s0379-0738(02)00352-3
31. van den Berge M, Wiskerke D, Gerretsen RR, Tabak J, Sijen T. DNA and RNA profiling of excavated human remains with varying postmortem intervals. *Int J Legal Med.* 2016;130(6):1471-1480. doi:10.1007/s00414-016-1438-9
32. Pozhitkov AE, Neme R, Domazet-Lošo T, et al. Tracing the dynamics of gene transcripts after organismal death. *Open Biol.* 2017;7(1):160267.

doi:10.1098/rsob.160267

33. Ferreira PG, Muñoz-Aguirre M, Reverter F, et al. The effects of death and post-mortem cold ischemia on human tissue transcriptomes. *Nat Commun.* 2018;9(1):490. doi:10.1038/s41467-017-02772-x.
34. Zapico CS, Menéndez ST, Núñez P. Cell death proteins as markers of early postmortem interval. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(15):2957-2962. doi:10.1007/s00018-013-1531-x.
35. Libri V, Miesen P, van Rij RP, Buck AH. Regulation of microRNA biogenesis and turnover by animals and their viruses. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(19):3525-3544. doi:10.1007/s00018-012-1257-1
36. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways [published correction appears in *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Dec;19(12):808] [published correction appears in *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 May;20(5):321]. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(1):5-20. doi:10.1038/s41580-018-0059-1
37. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402
38. Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA.* 2019;25(1):1-16. doi:10.1261/rna.068692.118
39. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):5451-5465. doi:10.1002/jcp.27486
40. Martínez-Rivera V, Negrete-García MC, Ávila-Moreno F, Ortiz-Quintero B. Secreted and Tissue miRNAs as Diagnosis Biomarkers of Malignant Pleural Mesothelioma. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):595. doi:10.3390/ijms19020595
41. Zhang Y, Fan M, Zhang X, et al. Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. *RNA.* 2014;20(12):1878-

1889. doi:10.1261/rna.045633.114

42. Jiang X, Yu M, Zhu T, et al. Kcnq1ot1/miR-381-3p/ETS2 Axis Regulates Inflammation in Mouse Models of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;19:179-189. doi:10.1016/j.omtn.2019.10.036
43. Chen G, Ma Y, Jiang Z, et al. Lico A Causes ER Stress and Apoptosis via Up-Regulating miR-144-3p in Human Lung Cancer Cell Line H292. *Front Pharmacol*. 2018;9:837. doi:10.3389/fphar.2018.00837
44. Terlecki-Zaniewicz L, Lämmermann I, Latreille J, et al. Small extracellular vesicles and their miRNA cargo are anti-apoptotic members of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(5):1103-1132. doi:10.18632/aging.101452
45. Liu H, Wei W, Wang X, et al. miR-23b-3p promotes the apoptosis and inhibits the proliferation and invasion of osteosarcoma cells by targeting SIX1. *Mol Med Rep*. 2018;18(6):5683-5692. doi:10.3892/mmr.2018.9611
46. Song J, Kang YH, Yoon S, Chun CH, Jin EJ. HIF-1 α :CRAT:miR-144-3p axis dysregulation promotes osteoarthritis chondrocyte apoptosis and VLCFA accumulation [published correction appears in *Oncotarget*. 2019 Jul 16;10(44):4609-4610]. *Oncotarget*. 2017;8(41):69351-69361. doi:10.18632/oncotarget.20615.
47. Shang A, Zhou C, Bian G, et al. miR-381-3p restrains cervical cancer progression by downregulating FGF7. *J Cell Biochem*. 2019;120(1):778-789. doi:10.1002/jcb.27438
48. Kong W, Yang L, Li PP, et al. MiR-381-3p inhibits proliferation, migration and invasion by targeting LRP6 in papillary thyroid carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(12):3804-3811. doi:10.26355/eurrev_201806_15264
49. Wu M, Fan B, Guo Q, et al. Knockdown of SETDB1 inhibits breast cancer progression by miR-381-3p-related regulation. *Biol Res*. 2018;51(1):39. doi:10.1186/s40659-018-0189-0.

50. He RQ, Wu PR, Xiang XL, et al. Downregulated miR-23b-3p expression acts as a predictor of hepatocellular carcinoma progression: A study based on public data and RT-qPCR verification. *Int J Mol Med*. 2018;41(5):2813-2831. doi:10.3892/ijmm.2018.3513.
51. Yang Q, Zhou Y, Cai P, et al. Downregulation of microRNA-23b-3p alleviates IL-1 β -induced injury in chondrogenic CHON-001 cells. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:2503-2512. doi:10.2147/DDDT.S211051
52. Zeng L, Sun Y, Li X, Wang J, Yan L. 10-Hydroxycamptothecin induces apoptosis in human fibroblasts by regulating miRNA-23b-3p expression. *Mol Med Rep*. 2019;19(4):2680-2686. doi:10.3892/mmr.2019.9927
53. Zhou W, Xu J, Wang C, Shi D, Yan Q. miR-23b-3p regulates apoptosis and autophagy via suppressing SIRT1 in lens epithelial cells. *J Cell Biochem*. 2019;120(12):19635-19646. doi:10.1002/jcb.29270
54. Huo F, Zhang C, He H, Wang Y. MicroRNA-144-3p inhibits proliferation and induces apoptosis of human salivary adenoid carcinoma cells via targeting of mTOR. *Biotechnol Lett*. 2016;38(3):409-416. doi:10.1007/s10529-015-2007-x
55. Li WC, Ma KJ, Lv YH, et al. Postmortem interval determination using 18S-rRNA and microRNA. *Sci Justice*. 2014;54(4):307-310. doi:10.1016/j.scijus.2014.03.001
56. Tu C, Du T, Ye X, Shao C, Xie J, Shen Y. Using miRNAs and circRNAs to estimate PMI in advanced stage. *Leg Med (Tokyo)*. 2019;38:51-57. doi:10.1016/j.legalmed.2019.04.002
57. Lv YH, Ma KJ, Zhang H, et al. A time course study demonstrating mRNA, microRNA, 18S rRNA, and U6 snRNA changes to estimate PMI in deceased rat's spleen. *J Forensic Sci*. 2014;59(5):1286-1294. doi:10.1111/1556-4029.12447
58. Zhang H, Zhang P, Ma KJ, et al. The selection of endogenous genes in

- human postmortem tissues. *Sci Justice*. 2013;53(2):115-120. doi:10.1016/j.scijus.2012.11.005
59. Sun N, Zhang L, Zhang C, Yuan Y. miR-144-3p inhibits cell proliferation of colorectal cancer cells by targeting BCL6 via inhibition of Wnt/ β -catenin signaling. *Cell Mol Biol Lett*. 2020;25:19. Published 2020 Mar 17. doi:10.1186/s11658-020-00210-3
60. Campos-Viguri GE, Peralta-Zaragoza O, Jiménez-Wences H, Longinos-González AE, Castañón-Sánchez CA, Ramírez-Carrillo M, Camarillo CL, Castañeda-Saucedo E, Jiménez-López MA, Martínez-Carrillo DN, Fernández-Tilapa G. MiR-23b-3p reduces the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cell lines via the reduction of c-Met expression. *Sci Rep*. 2020 Feb 24;10(1):3256. doi: 10.1038/s41598-020-60143-x. PMID: 32094378; PMCID: PMC7039958.
61. Della Bella E, Stoddart MJ. Cell detachment rapidly induces changes in noncoding RNA expression in human mesenchymal stromal cells. *Biotechniques*. 2019;67(6):286-293. doi:10.2144/btn-2019-0038
62. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013;3(3):71-85.
63. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:W169-W173. doi:10.1093/nar/gkt393
64. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I, Hatzigeorgiou AG. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics*. 2012;28(6):771-776. doi:10.1093/bioinformatics/bts043
65. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D296-D302. doi:10.1093/nar/gkx1067

66. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D239-D245. doi:10.1093/nar/gkx1141
67. De Siqueira A, Rodrigues KB, Gonçalves-Júnior V, et al. Exhumation of Wistar rats experimentally exposed to the carbamate pesticides aldicarb and carbofuran: A pathological and toxicological study. *Exp Toxicol Pathol.* 2016;68(6):307-314. doi:10.1016/j.etp.2016.03.002
68. Iyengar GV. Autopsy sampling and elemental analysis: errors arising from post-mortem changes. *J Pathol.* 1981;134(3):173-180. doi:10.1002/path.1711340302
69. Kuribayashi H, Cui F, Hirakawa K, Kanawaku Y, Ohno Y. Measurement of temperature changes in cooling dead rats using magnetic resonance thermometry. *Leg Med (Tokyo).* 2011;13(6):314-317. doi:10.1016/j.legalmed.2011.07.005
70. Usumoto Y, Kudo K, Tsuji A, Ihama Y, Ikeda N. Predictive equation to estimate post-mortem interval using spectrophotometric blood-colour values. *Med Sci Law.* 2019;59(1):36-41. doi:10.1177/0025802418819611
71. Bohnert M, Weinmann W, Pollak S. Spectrophotometric evaluation of postmortem lividity. *Forensic Sci Int.* 1999;99(2):149-158. doi:10.1016/s0379-0738(98)00183-2
72. Inoue M, Suyama A, Matuoka T, Inoue T, Okada K, Irizawa Y. Development of an instrument to measure postmortem lividity and its preliminary application to estimate the time since death. *Forensic Sci Int.* 1994;65(3):185-193. doi:10.1016/0379-0738(94)90274-7
73. Kang S, Kassam N, Gauthier ML, O'Day DH. Post-mortem changes in calmodulin binding proteins in muscle and lung. *Forensic Sci Int.* 2003;131(2-3):140-147. doi:10.1016/s0379-0738(02)00426-7.

74. Keough N, Myburgh J, Steyn M. Scoring of Decomposition: A Proposed Amendment to the Method When Using a Pig Model for Human Studies. *J Forensic Sci.* 2017;62(4):986-993. doi:10.1111/1556-4029.13390
75. Parks CL. A study of the human decomposition sequence in central Texas. *J Forensic Sci.* 2011;56(1):19-22. doi:10.1111/j.1556-4029.2010.01544.x
76. Gelderman HT, Boer L, Naujocks T, IJzermans ACM, Duijst WLJM. The development of a post-mortem interval estimation for human remains found on land in the Netherlands. *Int J Legal Med.* 2018;132(3):863-873. doi:10.1007/s00414-017-1700-9
77. Statheropoulos M, Agapiou A, Zorba E, et al. Combined chemical and optical methods for monitoring the early decay stages of surrogate human models. *Forensic Sci Int.* 2011;210(1-3):154-163. doi:10.1016/j.forsciint.2011.02.023
78. Kori S. Time since Death from Rigor Mortis : Forensic Prospective. *J Forensic Sci Crim Inves.* 2018;9(5):1–10. DOI: 10.19080/JFSCI.2018.09.555771
79. Krompecher T. Experimental evaluation of rigor mortis. VIII. Estimation of time since death by repeated measurements of the intensity of rigor mortis on rats. *Forensic Sci Int.* 1994;68(3):149-159. doi:10.1016/0379-0738(94)90354-9
80. Mohammad Asif Iqbal MU and SLF. Recent advances in the estimation of post-mortem interval in forensic taphonomy. *Aust J Forensic Sci.* 2018;52(1):1–17. <https://doi.org/10.1080/00450618.2018.1459840>
81. Paczkowski S, Schütz S. Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;91(4):917-935. doi:10.1007/s00253-011-3417-x
82. Tschui J, Jackowski C, Schwendener N, Schyma C, Zech WD. Post-mortem CT and MR brain imaging of putrefied corpses. *Int J Legal Med.* 2016;130(4):1061-1068. doi:10.1007/s00414-016-1385-5
83. Bauer M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1(1):69-74. doi:10.1016/j.fsigen.2006.11.002.

84. Koppelkamm A, Vennemann B, Lutz-Bonengel S, Fracasso T, Vennemann M. RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. *Int J Legal Med.* 2011;125(4):573-580. doi:10.1007/s00414-011-0578-1
85. Guo C, Liu S, Wang J, Sun MZ, Greenaway FT. ACTB in cancer. *Clin Chim Acta.* 2013;417:39-44. doi:10.1016/j.cca.2012.12.012
86. Tao L, Ma J, Han L, et al. Early postmortem interval estimation based on Cdc25b mRNA in rat cardiac tissue. *Leg Med (Tokyo).* 2018;35:18-24. doi:10.1016/j.legalmed.2018.09.004
87. Elghamry, H.A., Hassan, F.M., Mohamed, M.I. et al. Estimation of the postmortem interval using GAPDH mRNA in skin and heart tissues of albino rats at different environmental conditions. *Egypt J Forensic Sci* 8, 69 (2018). <https://doi.org/10.1186/s41935-018-0102-6>
88. Lv YH, Ma JL, Pan H, et al. Estimation of the human postmortem interval using an established rat mathematical model and multi-RNA markers. *Forensic Sci Med Pathol.* 2017;13(1):20-27. doi:10.1007/s12024-016-9827-4
89. Nagy C, Maheu M, Lopez JP, et al. Effects of postmortem interval on biomolecule integrity in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74(5):459-469. doi:10.1097/NEN.0000000000000190
90. Ibrahim, S.F., Ali, M.M., Basyouni, H. et al. Histological and miRNAs postmortem changes in incisional wound. *Egypt J Forensic Sci* 9, 37 (2019). <https://doi.org/10.1186/s41935-019-0141-77>
91. Sanoudou D, Kang PB, Haslett JN, Han M, Kunkel LM, Beggs AH. Transcriptional profile of postmortem skeletal muscle. *Physiol Genomics.* 2004;16(2):222-228. doi:10.1152/physiolgenomics.00137.2003
92. Zhu Y, Wang L, Yin Y, Yang E. Systematic analysis of gene expression patterns associated with postmortem interval in human tissues. *Sci Rep.* 2017;7(1):5435. doi:10.1038/s41598-017-05882-0

93. Formosa A, Markert EK, Lena AM, et al. MicroRNAs, miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495 and miR-654-3p, mapped to the 14q32.31 locus, regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene*. 2014;33(44):5173-5182. doi:10.1038/onc.2013.451
94. Huang RS, Zheng YL, Zhao J, Chun X. microRNA-381 suppresses the growth and increases cisplatin sensitivity in non-small cell lung cancer cells through inhibition of nuclear factor- κ B signaling. *Biomed Pharmacother*. 2018;98:538-544. doi:10.1016/j.biopha.2017.12.092
95. Chen WC, Luo J, Cao XQ, Cheng XG, He DW. Overexpression of miR-381-3p promotes the recovery of spinal cord injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(17):5429-5437. doi:10.26355/eurrev_201809_15802.
96. Chen L, Han L, Zhang K, et al. VHL regulates the effects of miR-23b on glioma survival and invasion via suppression of HIF-1 α /VEGF and β -catenin/Tcf-4 signaling. *Neuro Oncol*. 2012;14(8):1026-1036. doi:10.1093/neuonc/nos122
97. Hu X, Wang Y, Liang H, et al. miR-23a/b promote tumor growth and suppress apoptosis by targeting PDCD4 in gastric cancer. *Cell Death Dis*. 2017;8(10):e3059. doi:10.1038/cddis.2017.447
98. Zhu R, Li X, Ma Y. miR-23b-3p suppressing PGC1 α promotes proliferation through reprogramming metabolism in osteosarcoma. *Cell Death Dis*. 2019;10(6):381. doi:10.1038/s41419-019-1614-1
99. Barbolat-Boutrand L, Joly-Tonetti N, Dos Santos M, et al. MicroRNA-23b-3p regulates human keratinocyte differentiation through repression of TGIF1 and activation of the TGF- β -SMAD2 signalling pathway. *Exp Dermatol*. 2017;26(1):51-57. doi:10.1111/exd.13119
100. Jawor P, Ząbek A, Wojtowicz W, Król D, Stefaniak T, Młynarz P. Metabolomic studies as a tool for determining the post-mortem interval (PMI) in stillborn calves. *BMC Vet Res*. 2019;15(1):189. doi:10.1186/s12917-019-

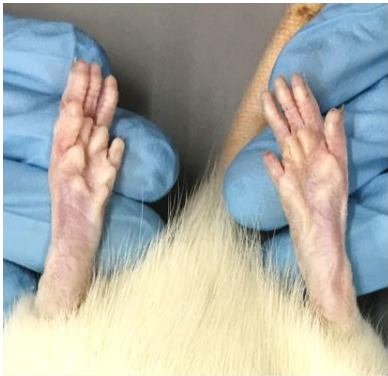
1935-4

101. Madea B, Kreuser C, Banaschak S. Postmortem biochemical examination of synovial fluid--a preliminary study. *Forensic Sci Int.* 2001;118(1):29-35. doi:10.1016/s0379-0738(00)00372-8.

ANEXO I.

Galería fotográfica de los cambios morfológicos presentados por las ratas en los diferentes IPM. En esta sección solo muestran los ejemplos mas representativos de cada tiempo y/o cambio morfológico.

IPM 0 h.



IPM 3 h.



IPM 6 h.



IPM 12 h.

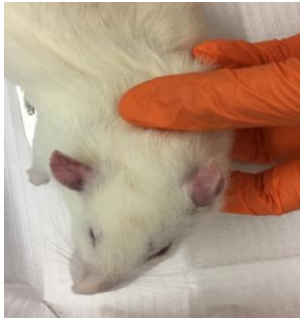


IPM 24 h.

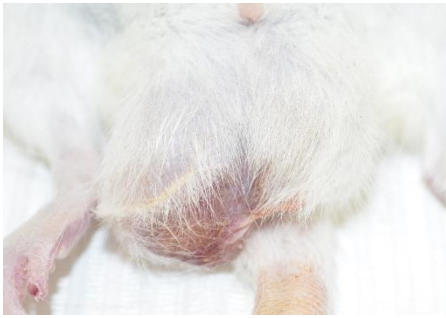


Suplementaria 1. Presencia de *Livor Mortis* en extremidades inferiores. Cambio de coloración por acumulación de sangre en las extremidades inferiores a 0, 3, 6, 12 y 24 horas de IPM

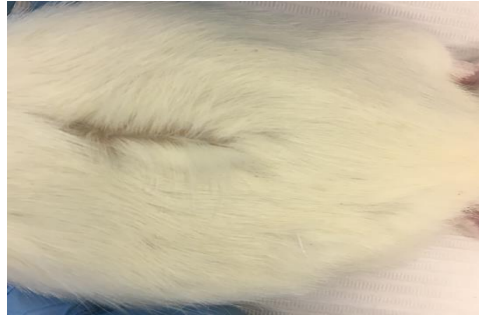
a) *Rigor mortis*



b) Deseccación



c) Pérdida de pelo



d) Distensión abdominal



Suplementaria 2. Cambios externos morfológicos *post-mortem*. Cambios morfológicos observados a diferentes tiempos en las ratas:

a) *Rigor mortis* superior, b) Deseccación genital, c) Pérdida de pelo y d) Distensión abdominal.

a) Edema



b) Mancha verde



c) Secreción de líxiviado



d) Dientes rosas



Suplementaria 3. Cambios externos morfológicos *post-mortem* en a 24h de IPM. Cambios morfológicos observados en la rata a)

Edema, b) Mancha verde, c) Secreción de líxiviado y d) Dientes rosas

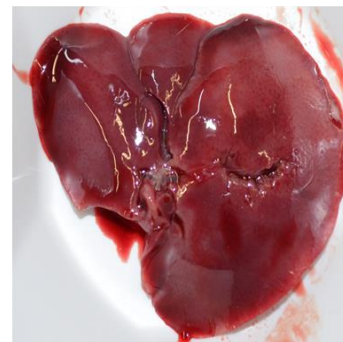
IPM 0 h.

IPM 3 h.

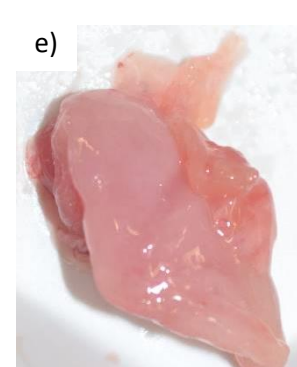
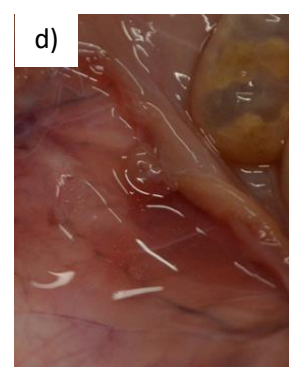
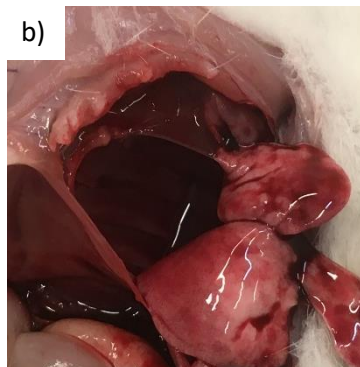
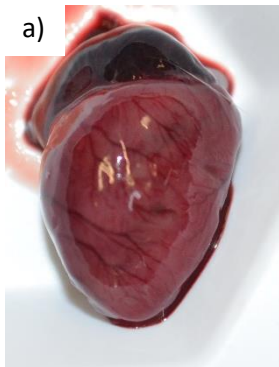
IPM 6 h.

IPM12 h.

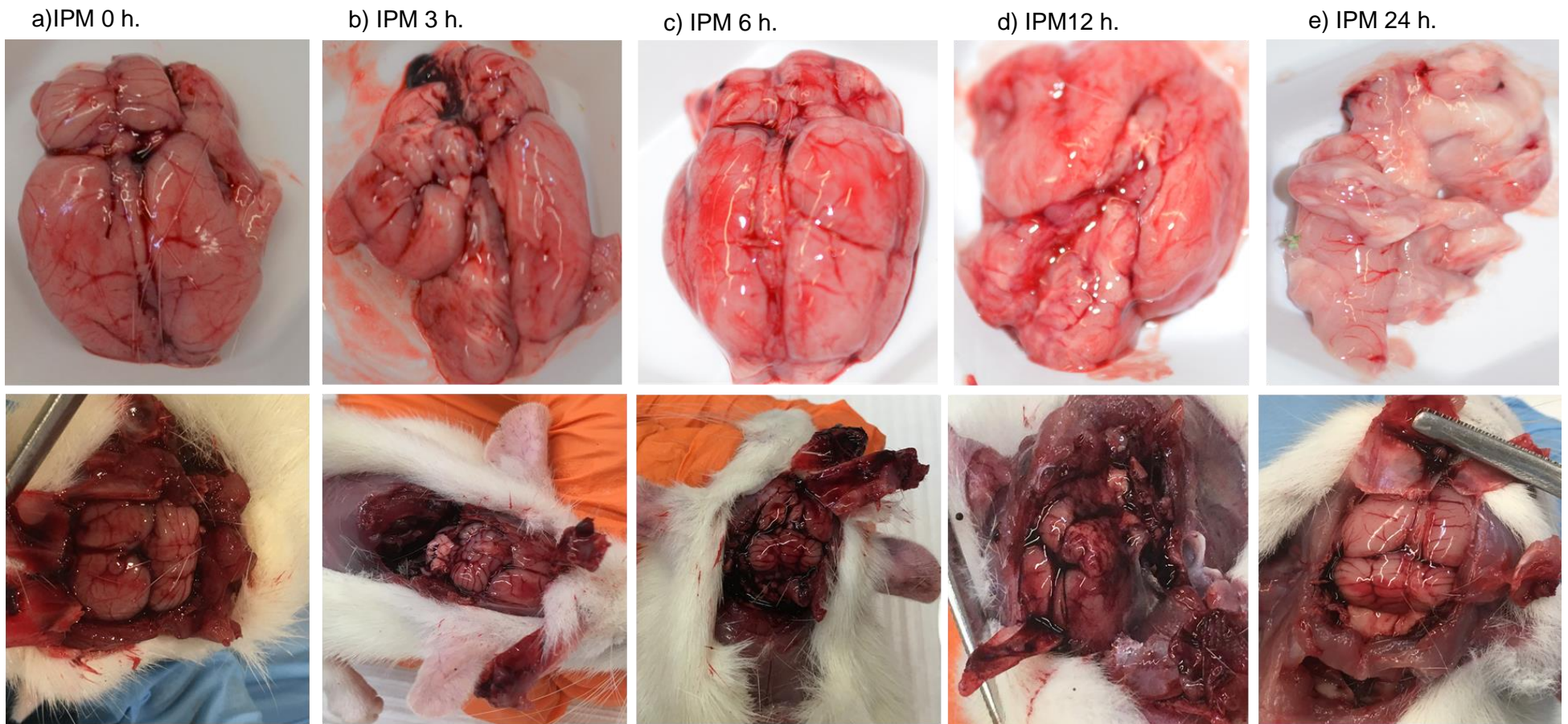
IPM 24 h.



Suplementaria 4. Perdida de consistencia y coloración en hígado a diferentes IPM. Cambio en la coloración y consistencia en el tejido hepático conforme el IPM, a las 0, 3, 6, 12 y 24 h



Suplementaria 5. Cambios morfológicos internos presentes en las ratas a diferentes IPM. Se observaron diferentes cambios morfológicos internos como a) Descoloración en Corazón, b) *Livor mortis* en pulmón, c) Hinchazón del intestino y d) Ascitis y e) *Livor mortis* y pérdida de consistencia en musculo,



Suplementaria 6. Licuefacción y edema cerebral en las ratas a diferente IPM. Presencia de licuefacción y edema cerebral fuera y dentro de la bóveda craneal en los IMP de 0, 3, 6, 12 y 24 horas.