



**Università
degli Studi
di Ferrara**

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE E BIOTECNOLOGICHE

CICLO XXXIII

COORDINATORE Prof. Pinton Paolo

LESIONI DI INTERESSE
MEDICO-LEGALE: ESPRESSIONE DI MARCATORI miRNA
NEL SOLCO CUTANEO DI
SOGGETTI IMPICCATI

Settore Scientifico Disciplinare MED/43



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE E BIOTECNOLOGICHE**

CICLO XXXIII

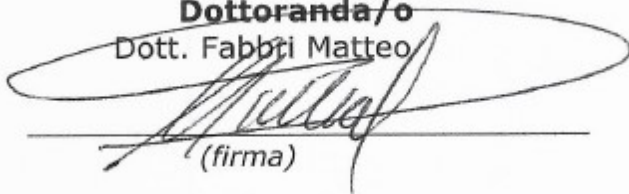
COORDINATORE Prof. Pinton Paolo

**LESIONI DI INTERESSE
MEDICO-LEGALE: ESPRESSIONE DI MARCATORI miRNA
NEL SOLCO CUTANEO DI
SOGGETTI IMPICCATI**

Settore Scientifico Disciplinare MED/43

Dottoranda/o

Dott. Fabbi Matteo



(firma)

Tutore

Prof. Neri Margherita



(firma)



Anni 2017/2020

Indice

Introduzione.....	4
1. Diagnosi cronologica e di vitalità delle lesioni cutanee in medicina- legale.....	5
1.1 Impiccamento e meccanismi di produzione del solco cutaneo.....	15
1.2 Indagini istologiche ed immunoistochimiche della cute del solco.....	17
2. MicroRNA: caratteristiche e funzione.....	24
2.1 L'espressione dei miRNA nella fase infiammatoria della lesione cutanea.....	30
3. Protocollo sperimentale.....	36
3.1 Obiettivi.....	36
3.2 Materiali e metodi.....	37
3.3 Risultati.....	45
3.4 Discussione.....	52
3.5 Considerazioni conclusive.....	54
4. Bibliografia.....	56

Introduzione

I microRNA (miRNA) sono una famiglia di piccoli RNA non codificanti, che agiscono inibendo l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Sono coinvolti in numerosi processi biologici, come la regolazione dello sviluppo embrionale, il controllo dei processi di differenziazione e proliferazione cellulari, ad interferiscono anche nella regolazione delle fasi che caratterizzano la risposta infiammatoria dei tessuti.

La possibilità che i microRNA siano coinvolti nella regolazione degli eventi cellulari e molecolari che caratterizzano la fase infiammatoria dei tessuti in risposta ad agenti fisici, chimici o infettivi, può acquisire interesse in senso medico-legale, in ragione delle problematiche relative alla diagnosi cronologica e di vitalità delle lesioni. Infatti, le alterazioni morfologiche e molecolari che si verificano a livello della cute quando questa è sottoposta ad insulto lesivo in seguito ad applicazione di energia traumatica, è fondamento delle indagini istologiche ed immunoistochimiche che forniscono gli elementi microscopici utili per la diagnosi cronologica e di vitalità delle lesioni cutanee.

L'applicazione di tecniche di biologia molecolare volte alla valutazione dell'espressione dei miRNA in solchi cutanei di soggetti impiccati, potrebbe essere utile per l'identificazione preliminare di molecole della fase infiammatoria, quando ancora non si apprezzano segni istologici di invasione locale leucocitaria e la ricerca di molecole glicoproteiche indagate attraverso indagini immunoistochimiche risulta negativa.

La prima parte di tale elaborato presenterà le tecniche di indagine istologica ed immunoistochimica volte alla diagnosi cronologica e di vitalità delle lesioni cutanee in medicina-legale.

La seconda parte descriverà le caratteristiche dei microRNA ed il loro meccanismo d'azione, soprattutto in relazione al loro ruolo nella regolazione della risposta infiammatoria.

Infine, il protocollo sperimentale si proporrà di fornire una valutazione preliminare relativa all'espressione dei miRNA in solchi cutanei di soggetti impiccati, al fine di ottenere informazioni sui processi molecolari che caratterizzano le lesioni cutanee subito dopo la loro formazione e che possono essere utili ai fini medico-legali.

1. Diagnosi cronologica e di vitalità delle lesioni cutanee in medicina- legale

La diagnosi cronologica della lesioni rispetto al momento del decesso, così come il giudizio di vitalità della stessa, sono spesso giudizi complessi, anche in considerazione del fatto che spesso non si verifica un passaggio immediato fra la vita e la morte. Infatti, nelle fasi immediatamente successive alla morte, mentre le funzioni vitali sono ormai cessate, permangono fenomeni di vita residua tissutale e cellulare che possono dar luogo a manifestazioni simili a quelle prodottesi in vita, come ad esempio la retrazione dei margini della ferita.

I caratteri di vitalità della lesione, valutati nel loro complesso in un'ottica globale ed integrata, constano di reazioni tissutali all'insulto traumatico, che possono essere macroscopicamente individuabili in: infiltrazione emorragica dei margini della ferita, reazione infiammatoria (edema ed eritema), emorragia profusa, formazione di ecchimosi, trombi e/o emboli.

L'infiltrazione dei margini della lesione rappresenta uno dei segni più noti ed affidabili nella valutazione della vitalità della ferita, anche se può essere scarsamente rappresentata in caso di morte immediata ovvero in caso di gravi condizioni di anemia e/o di scompenso cardio-circolatorio del soggetto.

Altre forme di reperti macroscopici che fanno deporre per lesioni cutanee vitali, sono riferibili alla valutazione della retrazione elastica dei margini delle soluzioni di continuo. Tale fenomeno, che comunque può realizzarsi anche a breve distanza dall'*exitus* per fenomeni di vita residua, può essere influenzato da particolari condizioni quali: sede della lesione, interessamento longitudinale o trasversale delle fibre connettivali, disposizione delle linee di fendibilità cutanea e/o presenza di aderenze a carico dei piani tissutali sottostanti.

Di notevole variabilità sono anche i processi di riparazione delle ferite, che possono essere influenzati da: fattori intrinseci (la cicatrizzazione, ad esempio, è favorita da una ferita lineare, con margini non retratti e di piccole dimensioni) oppure da fattori generali che possono ostacolare i processi riparativi quali età avanzata, condizioni di alterata nutrizione, ridotta temperatura dell'area lesa, presenza di malattie metaboliche (diabete mellito ad esempio), assunzione di farmaci (cortisonici).

Ai reperti ottenuti dall'indagine macroscopica vengono integrate le informazioni ricavate dall'indagine microscopica, che consente l'obiettivazione delle reazioni cellulari e tissutali che seguono all'applicazione delle forze traumatiche produttive della lesione. L'indagine istologica consente di formulare una diagnosi attendibile sia sulla vitalità o meno della lesione, sia sull'epoca di formazione della stessa.

Le indagini istologiche volte alla determinazione della vitalità delle lesioni ed alla loro datazione rispetto al decesso, sono riferibili alle modificazioni cellulari che si verificano nel tessuto lesionato, in accordo con le fasi che caratterizzano la risposta del tessuto ad un insulto lesivo: fase infiammatoria, fase proliferativa e fase di riorganizzazione.

Il processo di guarigione di una lesione vede inizialmente prevalere una fase infiammatoria, dove si presentano fenomeni trasudatizi, essudativi ed emostatici che sono più intensi rispetto alla risposta cellulare. In questa fase, ad una iniziale e fugace vasocostrizione, segue una reazione di vasodilatazione ed incremento della permeabilità vascolare con trasudazione interstiziale di macromolecole plasmatiche proteiche (essudato).

I fenomeni emorragici sono seguiti da una fase emostatica, con formazione del reticolo di fibrina, deposito degli elementi corpuscolati del sangue ed aggregazione piastrinica.

Successivamente si assiste alla migrazione, in corrispondenza del sito di lesione, dapprima di granulociti neutrofili, e, in tempi successivi, di cellule della linea monocito/macrofagica, di mast cellule e di linfociti T (Tabella 1.1), che provengono dai margini della ferita e dalla base della stessa.

La fase successiva si insatura a circa 3 giorni dall'evento traumatico ed è caratterizzata dalla comparsa dei fenomeni di riepitelizzazione tissutale e di riparazione della ferita con formazione del tessuto di granulazione (fibroblasti, fibrociti e comparsa aree di angiogenesi).

A distanza di circa 1-2 settimane si verifica una riorganizzazione tissutale con scomparsa del tessuto di granulazione, deposito di fibre collagene, elastina, proteoglicani, glicoproteine e formazione del tessuto cicatriziale.

Relativamente alle caratteristiche istologiche delle lesioni cutanee si ripropone la seguente cronologia delle modificazioni istologiche delle lesioni vitali, in cui si evidenziano i cambiamenti delle popolazioni cellulari che intervengono nelle fasi infiammatoria, proliferativa e di riorganizzazione del tessuto lesionato (Tabella 1.1).

Tempo trascorso dalla formazione della lesione	Elementi istologici
< 20 min – 1 h	Distruzione tissutale e cellulare, emorragia, nessuna reazione cellulare, nessun segno di invasione granulocitica.
< 1 h	Granulociti neutrofili in parte in corrispondenza delle pareti vasali, in parte migrati nei tessuti.
1 h	Emorragia, edema tissutale, singoli leucociti polimorfonucleati nei tessuti.
2 h	Degranulazione delle mast cellule, infiltrazione tissutale da parte di leucociti polimorfonucleati, necrosi tissutale.
2-4 h	Invasione cellulare monocitaria, reazioni di fagocitosi.
4-6 h	Incremento dell'iperemia nei tessuti periferici, deposizione di fibrina, formazione periferica di un "muro" leucocitario che coinvolge anche la popolazione granulocitaria.
6-8 h	Necrosi delle cellule e dei tessuti, aumentata espressione delle cellule infiammatorie, incremento della fagocitosi.
8-12 h	Incremento e attivazione dei monociti ed istiociti, invasione di singoli macrofagi.
12-16 h	Incremento graduale di cellule mononucleate e degradazione leucocitaria.
16-32 h	Mobilizzazione degli elementi cellulari istiocitari, formazione di fibre collagene con migrazione di fibroblasti e fibrociti, neoangiogenesi.
32-72 h	Formazione di tessuto di granulazione con deposizione di fibre collagene e formazione di nuovi vasi capillari con all'interno macrofagi (siderofagi, lipofagi).
3-4 giorni	Deposito di fibre collagene, riduzione del numero dei macrofagi, nuova comparsa di mast cellule, comparsa di cellule giganti polinucleate.
4-10 giorni	Formazione di tessuto cicatriziale, riduzione di neutrofili e macrofagi, persistenza di siderofagi.
>10 giorni	Abbondante deposito di tessuto cicatriziale, riduzione della vascolarizzazione, possibile persistenza di depositi di emosiderina.

Tabella 1.1 Cronologia delle modificazioni istologiche delle lesioni vitali.

Accanto alle alterazioni istologiche precedentemente elencate, nel corso sia della fase infiammatoria, sia dei fenomeni di proliferazione e riparazione tissutale, vengono liberate molecole quali citochine (IL-1, TNF -tumor necrosis factor-, IL-6, IL-2, IFN- γ , M-CSF -macrophage colony stimulating factor-, TGF- β -trasforming growth factor β -), fattori chemiotattici (chemiochine α , chemiochine β , linfoactine, IL-8, MCP-1 -macrophage chemotactic protein-1-), fattori di crescita

(EGF - epidermal growth factor-, FGF -fibroblast growth factor-, VEGF -vascular endothelial growth factor-), molecole della matrice extracellulare (fibronectina, collagene tipo I, III, IV, VII, elastina, fibrillina, proteoglicani, glicosaminoglicani, laminina), proteasi, integrine (LFA-1 - lymphocyte function associated antigen 1-, MAC-1 -macrophage 1 antigen-, VLA-4 -very late antigen-), fosfolipidi (PAF - platelet activating factor-)¹.

La risposta più precoce all'insulto lesivo consiste nell'attivazione delle cellule endoteliali, indotta da mediatori liberati dal tessuto dermo-epidermico nelle prime ore dopo il trauma. Tali mediatori sono molecole che hanno un breve tempo di emivita come istamina, serotonina, leucotrieni, prostaglandine (PGE1, PGE2, PGF2, prostaciline (PGI2), trombossano, PAF, sintetasi ossido nitrica, proteasi plasmatiche.

Le amine vasoattive (istamina e serotonina) consentono di esprimere un giudizio di certezza sulla vitalità della lesione, poiché indagini biochimiche hanno rilevato la loro massima concentrazione tissutale rispettivamente dopo circa 20-30 e 10 minuti dalla produzione della lesione.

Per quanto concerne la ricerca delle proteasi plasmatiche, esse sono state studiate attraverso tecniche d'indagine istochimico-enzimatiche, mediante le quali sono stati identificati diversi tipi di enzimi implicati nella riparazione dei tessuti della lesione (ATPasi, esterasi, aminopeptidasi, arilaminopeptidasi, fosfatasi acide e alcaline). Tali molecole compaiono almeno un'ora dopo la produzione della lesione stessa. Infatti, le ATPasi e le esterasi sono determinabili dopo circa un'ora; successivamente sono dosabili l'aminopeptidasi (dopo due ore), le fosfatasi acide (dopo quattro ore) ed infine le fosfatasi alcaline (dopo otto ore).

Le amine vasoattive e le proteasi plasmatiche giocano un ruolo importante nelle fasi precoci della risposta infiammatoria, in associazione con i metaboliti dell'acido arachidonico.

Infatti, durante la risposta infiammatoria, l'acido arachidonico viene metabolizzato attraverso la via delle lipossigenasi con produzione di molecole aventi azione antinfiammatoria e leucotrieni. Questi ultimi, a loro volta, sono coinvolti nell'attivazione piastrinica e leucocitaria ed come vasocostrittori a livello endoteliale.¹ Il leucotriene β_4 , molecola che origina dall'attivazione dei fosfolipidi di membrana delle cellule endoteliali, dei neutrofili, dei macrofagi, dei linfociti e delle mast cellule, è costantemente presente nelle lesioni vitali, mentre è assente nelle lesioni inflitte post-mortem².

¹ Cecchi R. Estimating wound age: looking into the future. *Int J legal Med* 124: 523-536, 2010.

² He L., Zhu J. Distinguishing antemortem from postmortem injuries by LTB4 quantification. *Forensic Sci Int* 81:11-16, 1996.

Altra molecola derivante dalla membrana fosfolipidica dalle cellule endoteliali è il PAF, fattore proteico che stimola l'attivazione e l'aggregazione piastrinica e favorisce la migrazione leucocitaria nel sito di lesione³.

L'altra via metabolica che si attiva a partire dall'acido arachidonico è quella delle cicloossigenasi (COX), che porta alla produzione delle prostaglandine (PGE1, PGE2, PGD2, PGF2 PG12), che inibiscono l'aggregazione piastrinica, aumentano la permeabilità vasale ed inducono la vasodilatazione. Tale via metabolica porta alla produzione anche di trombossano (TXA2), molecola che al contrario delle prostaglandine induce vasocostrizione e promuove l'aggregazione piastrinica⁴.

Infine, l'attivazione delle cellule endoteliali comporta anche la produzione di ossido nitrico (NO), sintetizzato dalla ossido nitrico sintetasi e che induce vasodilatazione, riduce l'adesione e l'aggregazione piastrinica, ostacola la liberazione di stimoli proinfiammatori e la conseguente migrazione dei leucociti nella sede di lesione¹.

In corrispondenza della lesione vengono prodotte citochine infiammatorie come IL-1, TNF, IL-6, IL-10, TGF- β , IL-1ra, presenti in ridotte concentrazioni ematiche in condizioni fisiologiche, nonché si verifica l'attivazione delle vie di trasduzione del segnale mediate dal fattore di trascrizione NFkB (nuclear factor kB).¹ Le prime citochine infiammatorie ad essere prodotte sono l'IL-1, l'IL-6 e il TNF α , che possono essere rilevate nel sito di lesione in un tempo compreso tra 5 minuti e 1-2 ore^{5,6}.

L'IL-6 è una citochina che non si trova nella cute sana e che viene prodotta principalmente dalle cellule appartenenti alla linea monocito/macrofagica; ha la funzione di favorire l'espressione delle molecole di adesione e delle chemiochine che agiscono sui monociti a livello delle cellule endoteliali. La presenza di tale molecola si positivizza significativamente dopo 20 minuti dal trauma, con un picco che si pone tra 60 e 90 minuti dallo stesso⁷.

L'IL-1 β non è presente nei cheratinociti della cute sana, tuttavia è possibile rilevarla nelle cellule del derma, nelle cellule endoteliali dei capillari e nelle cellule epiteliali che rivestono i dotti escretori delle ghiandole sudoripare. In caso di lesione cutanea, una iniziale positivizzazione per questa proteina è stata osservata dopo 15- 20 minuti dal trauma, con un picco stimato a 30-60

³ Ono E., Taniguchi M., Mita H., Fukutomi Y., Higashi N., Miyazaki E., Kumamoto T., Akiyama K. Increased production of cysteinyl leukotrienes and prostaglandin D2 during human anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 39:72–80, 2008.

⁴ Hernández-Cueto C., Vieira D.N., Girela E., Marques E., Calvo M.D., Villalobos M., Oliveira de Sà F., Villanueva E. Prostaglandin F2a (PGF2a): an inadequate marker of the vitality of wounds? *Int J Leg Med* 106:312–314, 1994.

⁵ Grellner W., Georg T., Wilske J. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds. *Forensic Sci Int* 113:251–264, 2000.

⁶ Sato Y., Ohshima T. The expression of mRNA of proinflammatory cytokines during skin wound healing in mice: a preliminary study for forensic wound age estimation (II). *Int J Legal Med* 113:140–145, 2000.

⁷ Grellner W. Time-dependent immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds. *Forensic Sci Int* 130:90–96, 2000.

minuti, soprattutto a carico dei cheratinociti degli strati spinoso e basale⁷. L'IL-1 α è una proteina presente nei cheratinociti e negli adenomeri ghiandolari della cute sana, ma che non ha assunto un valore rilevante nel determinismo della vitalità e nella datazione delle lesioni cutanee.

Il TNF esiste in due isoforme: TNF α e TNF β o linfotossina. Il TNF α è prodotto soprattutto dai monociti, mentre la linfotossina viene prodotta da cellule del tessuto linfatico. Il TNF α è prodotto in ridotte quantità dai cheratinociti della cute sana; un incremento nella produzione di TNF α si evidenzia circa 15 minuti dopo il trauma con un picco atteso a 60-90 minuti^{5,7}. Inoltre, si riporta un suo significativo aumento nelle mast cellule presenti a livello cutaneo dopo 5 minuti dal trauma, con un picco che si attesta a circa un'ora dallo stesso⁸.

Le citochine ad azione antinfiammatoria (IL-10, TGF- α , TGF- β , IL-1ra) vengono prodotte da cellule della linea monocito/macrofagica.

Il TGF- α è debolmente espresso in corrispondenza della cute normale, tuttavia si evidenzia un incremento nella sua espressione circa 10 minuti dopo l'applicazione dell'insulto lesivo, con un picco che si raggiunge a 30-60 minuti. Il TGF- β è prodotto costitutivamente nel tessuto connettivo ed un marcato incremento nella sua espressione dopo diversi minuti dall'applicazione del trauma, verosimilmente in conseguenza dell'infiltrazione piastrinica, con un picco tra i 30 e 60 minuti⁹.

Le chemiochina IL-8 favorisce la migrazione presso il sito di lesione di neutrofilii, linfociti T e cheratinociti, e la sua espressione indica una lesione prodottasi da 1 a 4 giorni prima. Le chemiochine MCP-1 e MIP-1 α , fattori chemiotattici per monociti e macrofagi, indicano una lesione cronologicamente databile ad almeno un giorno prima¹⁰.

Per quanto concerne l'espressione delle proteine che consentono l'adesione e la migrazione delle cellule leucocitarie dal torrente ematico al sito di lesione, esse vengono espresse in particolar modo sull'endotelio delle venule post-capillari, dove le giunzioni intercellulari tra le cellule endoteliali sono ridotte, e questo consente una più facile diapedesi dei leucociti^{11,12}. Queste molecole interagiscono con molecole di superficie glicoproteiche presenti sui leucociti (integrine), consentendone dapprima i processi di marginazione e pavimentazione a ridosso della parete vasale e, successivamente, la loro fuoriuscita (diapedesi).

La selectina P (CD62P) è una glicoproteina presente in corpuscoli nelle cellule endoteliali e

⁸ Bacci S., Romagnoli P., Norelli G.A., Forestieri A.L., Bonelli A. Early increase in TNF-alpha-containing mast cells in skin lesions. *Int J Legal Med* 120:138–142, 2006.

⁹ Grellner W., Vieler S., Madea B. Transforming growth factors (TGF-alpha and TGF-beta1) in the determination of vitality and wound age: immunohistochemical study on human skin wounds. *Forensic Sci Int* 153:174–180, 2005.

¹⁰ Kondo T. Timing of skin wounds. *Leg Med (Tokyo)* 9:109–114, 2007.

¹¹ Van der Laan N., de Leij L.F.M.H., Ten Duis H.J. Immuno-histopathological appearance of three different types of injury in human skin. *Inflamm Res* 50:350–356, 2001.

¹² Jiao A., Fish S.C., Mason L.E., Shelling S.H., Goldman S.J., Williams C.M. A role for endothelial selectins and nonallergic inflammatory disease. *Ann Allergy Asthma Immunol* 98:83–88, 2007.

nei granuli secretori delle piastrine. Quando le cellule endoteliali e le piastrine vengono stimulate da molecole come istamina o trombina, in un tempo di 1-2 minuti, si verifica la traslocazione di queste molecole sulla superficie cellulare, con picco di espressione che si attesta intorno a 5-10 minuti. (alcuni studi hanno mostrato una positività a partire da 3 minuti dalla formazione della lesione)¹³.

La selectina E (CD62E) è una glicoproteina che viene sintetizzata dalle cellule endoteliali delle venule post-capillari e nelle venule dei linfonodi solo dopo stimolo da parte di citochine infiammatorie quali IL-1 e TNF α o lipopolisaccaride. Il suo ruolo è quello di legarsi alle proteine di superficie presenti sui neutrofilo, sui monociti e sui linfociti T, consentendone la migrazione nel sito di lesione. Generalmente viene espressa a distanza di un'ora dall'applicazione dell'evento lesivo, con un picco che si assesta tra le 4-6 ore¹³.

L'immunoglobulina ICAM-1 (CD54) è una molecola di adesione che si presenta sulla superficie delle cellule endoteliali e la sua espressione aumenta dopo l'azione stimolante indotta da IL-1 e TNF α ; tale molecola interagisce con molecole superficiali di neutrofilo, monociti e linfociti. ICAM-1 è presente nella cute sana, seppur in basse concentrazioni, nei cheratinociti, nelle cellule endoteliali e nei leucociti attivati. In queste cellule, la positività per tale molecola dopo l'insulto lesivo si presenta da 1 a 3 giorni dopo¹⁴.

L'immunoglobulina VCAM-1 (CD106) viene anch'essa stimolata nella sua produzione da IL-1 e TNF α e ha funzione di adesione con le cellule presenti nel torrente ematico. Non è presente sulla cute ed un suo incremento significativo si ha circa 3 ore dopo l'insulto lesivo¹⁵.

La selectina L (CD62L) rappresenta una proteina superficiale dei neutrofilo che favorisce il legame di queste cellule con le cellule endoteliali attivate dalle citochine IL-1, TNF α e IFN. Non viene utilizzata né per la determinazione delle vitalità della lesione, né per la sua datazione, poiché viene espressa sui leucociti attivati sia nella cute sana che in quella lesionata¹³.

Altro marker studiato è la fibronectina, proteina che in caso di lesione favorisce l'adesione e la migrazione di fibroblasti, cheratinociti e cellule endoteliali e che consente di accertare la vitalità delle lesioni poiché appare tra i 10 e 20 minuti dalla produzione della stessa¹⁶.

Il collagene tende a presentarsi soprattutto nel corso della fasi tardive di proliferazione e rimodellamento tissutale; infatti, il collagene di tipo III si apprezza a circa 2-3 giorni dalla produzione della lesione, il collagene di tipo IV e V dopo 3 giorni ed il collagene di tipo I dopo 5 giorni¹⁶.

¹³ Dressler J., Bachmann L., Koch R., Müller E. Enhanced expression of selectins in human skin wounds. *Int J Legal Med* 112:39-44, 1999.

¹⁴ Dressler J., Bachmann L., Kasper M., Hauck J.G., Müller E. Time dependence of the expression of ICAM-1 (CD 54) in human skin wounds. *Int J Legal Med* 110:299-304, 1997.

¹⁵ Dressler J., Bachmann L., Koch R., Müller E. Estimation of wound age and VCAM-1 in human skin. *Int J Legal Med* 112:159-162, 1999.

¹⁶ Kondo T., Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Science International* 203: 93-98, 2010.

Infine, è stato riscontrato un incremento nella produzione di FGF e VEGF dopo 24 ore dalla comparsa della lesione¹⁷.

Attraverso le tecniche di indagine immunoistochimiche, sono stati valutati altri marker che, tuttavia, non si presentano nella fasi precoci della risposta infiammatoria: l'ubiquitina è presente nei neutrofili a partire da 4 ore dalla comparsa della lesione¹⁸; la positivizzazione di anticorpi anti CD45¹⁹, (molecola presente sulla superficie dei fibrociti) si presenta dopo 4 giorni; la proteina p53 (molecola pro- apoptotica) si presenta dopo 3 giorni dall'insulto lesivo^{20,21}.

Infine, si ricordano gli studi²² che hanno rilevato l'importanza delle mast cellule quali elementi che forniscono informazioni importanti in merito alla cronologia della lesione. L'utilizzo di anticorpi anti-triptasi e anti-chimasi, ha consentito di evidenziare un incremento rapido della concentrazione di mast cellule nel sito di lesione, con un picco che si attesta a 1-3 ore dalla produzione della lesione stessa²³. Tale dato veniva confermato da uno studio successivo, che mostrava altresì la positività per CD15 e IL-15 in lesioni cutanee formatesi in un tempo inferiore a 5 minuti²⁴.

Si ricorda, inoltre, che per quanto concerne la vitalità delle lesioni, nonché la determinazione cronologica della stessa, sono stati tentati approcci di biologia molecolare volti alla ricerca dell'RNA messaggero responsabile dell'espressione delle chemochine e citochine notoriamente coinvolte nella risposta cutanea cellulare delle lesioni. Tecniche di Real Time PCR utilizzate su lesioni cutanee hanno evidenziato un incremento dell'espressione di mRNA traducanti per IL-1 α , IL-1 β , TNF- α (picchi tra 48 e 72 ore dalla formazione della lesione rispetto al decesso)²⁵, IL-6 (picco a 6 ore dalla formazione delle lesione), IL-10 (incremento rilevato a partire da 15 minuti

¹⁷ Takamiya M., Saigusa K., Aoki Y. Immunohistochemical study of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression for age determination of cutaneous wounds. *Am J Forensic Med Pathol* 23:264–267, 2002.

¹⁸ Kondo T., Tanaka J., Ishida Y., Mori R., Takayasu T., Ohshima T. Ubiquitin expression in skin wounds and its application to forensic wound age determination. *Int J Legal Med* 116:267–272, 2002.

¹⁹ Ishida Y., Kimura A., Takayasu T., Eisenmenger W., Kondo T. Detection of fibrocytes in human skin wounds and its application for wound age determination. *Int J Legal Med* 123:299–304, 2009.

²⁰ Antoniadis H.N., Galanopoulos T., Neville-Golden J., Kiritsy C.P., Lynch S.E. p54 expression during normal tissue regeneration in response to acute cutaneous injury in swine. *J Clin Invest* 93:2206–2214, 2004.

²¹ Hausmann R., Nerlich A., Betz P. The time-related expression of p53 protein in human skin wounds—a quantitative immunohistochemical analysis. *Int J Legal Med* 111:169–172, 1998.

²² Bonelli A., Bacci S., Norelli G.A. Affinity cytochemistry analysis of mast cells in skin lesions: a possible tool to assess the timing of lesions after death. *Int J Legal Med* 117:331–334, 2003.

²³ Bonelli A., Bacci S., Vannelli B., Norelli G.A. Immunohistochemical localization of mast cells as a tool for the discrimination of vital and postmortem lesions. *Int J Legal Med* 117:14–18, 2003.

²⁴ Turillazzi E., Vacchiano G., Lune-Maldonado A., Neri M., Pomara C., Rabozzi R., Riezzo I., Fineschi V., Tryptase, CD-15 and IL-15 as reliable markers for the determination of soft and hard ligature marks vitality, *Histol Histopathol*, 25: 1539-1546, 2010.

²⁵ Sato Y., Ohshima T. The expression of mRNA of proinflammatory cytokines during skin wound healing in mice: a preliminary study for forensic wound age estimation. *Int J Legal Med* 133: 140-145, 2010.

dalla formazione della lesione)²⁶, COX-2 e MCP-1 (aumento significativo rispettivamente a un'ora e a tre ore dalla formazione della lesione)²⁷.

Si riporta, quindi, la seguente tabella riassuntiva indicante la cronologia della positivizzazione delle molecole sopradescritte, in rapporto ad indagini di immunistoichimica (Tabella 1.2).

Marker	Tempo di comparsa
TNFα	5-10 minuti
IL-1	> 30 minuti
Selectina P	1-3 minuti
Selectina E	5-10 minuti
ICAM-1	1-2 ore
VCAM-1	3 ore
TGF α	circa 10 minuti
TGF β	> 10 minuti
Collagene I	5 giorni
Collagene III	2-3 giorni
Collagene IV	3 giorni
Collagene V	3 giorni
Fibronectina	10-20 minuti
IL-8	1-2 giorni
MCP-1	1 giorno
MIP-1α	1 giorno
VEGF	> 1 giorno
Ubiquitina	> 7 giorni

Tabella 1.2 Marker immunistoichimici e tempi di comparsa.

Per quanto concerne i dati ottenuti attraverso l'utilizzo di tecniche di indagine di immunistoichimica, è evidente come le fasi più precoci della risposta infiammatoria siano quelle dove con più difficoltà ci si può esprimere in merito alla cronologia degli eventi molecolari.

L'espressione delle molecole quali citochine, amine vasoattive, molecole della matrice extracellulare e molecole di adesione cellulare, che risultano utili per la valutazione della vitalità

²⁶ Takamiya M., Fujita S., Saigusa K., Aoki Y. A study on mRNA expressions of interleukin 10 during fracture healing for wound age determination. *Leg Med* 10:131-137, 2008.

²⁷ Bai R., Wan I., Shi M. The time dependent expression of IL-beta. COX 2, MCP-1 mRNA in skin wounds of rabbits. *Forensic Sci Int* 175: 193-197, 2008.

delle lesioni e che si positivizzano entro la prima ora, e più precisamente entro i primi 15 minuti¹, quando la migrazione cellulare istologica leucocitaria è ridotta, sono:

- TNF α : positività delle mast cellule in corrispondenza del sito del trauma a partire da 5 minuti con picco a 1 ora;
- cheratinociti positivi a IL-1 β , prima in corrispondenza degli strati basale e spinoso, poi nello strato granuloso: > 15-20 minuti con picco a 30-60 minuti;
- cheratinociti positivi a TNF α : > 15 minuti con picco a 30-60 minuti;
- cheratinociti positivi a IL-6: 20 minuti con picco a 60-90 minuti;
- istamina: > 15-30 minuti;
- serotonina: < 5 minuti;
- fibrina: > dopo pochi minuti, anche se può trovarsi anche post-mortem;
- fibronectina: > 20 minuti, positiva anche in lesioni post-mortali;
- selectina P: 1-3 minuti con picco a 10-15 minuti;
- selectina E: incremento iniziale a 5-10 minuti, evidente a 30 minuti e picco a 4-6 ore.

Inoltre, la vitalità delle lesioni cutanee può essere indagata attraverso lo studio di molecole che non sono presenti o si trovano in scarse quantità nella cute sana, oppure attraverso lo studio di molecole assenti nelle lesioni cutanee prodottesi dopo il decesso. Tali dati consentirebbero una diagnosi differenziale tra lesioni prodotte in vita o post-mortali. (Tabella 1.3).

Molecola	Presenza nella cute
IL-1β	Non presente nei cheratinociti. Presente nel derma e nei dotti escretori delle ghiandole sudoripare
TNFα	Raro nei cheratinociti
IL-6	Raro nei cheratinociti
VCAM-1	Rara nei cheratinociti
Selectina E	Non presente
Selectina P	Presenza individuo dipendente
VAP-1 (<i>Vascular Adhesion Protein-1</i>)	Prodotta dal danno vasale
PAF (<i>Platelet Activating Factor</i>)	Prodotta dal danno vasale
Leucotriene β4	Assente in lesioni post-mortali
Catepsina A e D	Assente in lesioni post-mortali
D dimero	Assente in lesioni post-mortali
Cheratinociti dello strato basale con RNA positivo per 3H-citidina	Assente in lesioni post-mortali

Tabella 1.3 Marker assenti o scarsamente presenti nella cute sana o assenti in lesioni post- mortali.

Integrando i dati istologici con le risultanze delle indagini immunohistochimiche è possibile determinare microscopicamente la vitalità delle lesioni e definire la cronologia delle stesse.

L'importanza delle recenti risultanze relative ad un incremento delle mast cellule nelle lesioni vitali, associato all'aumento di produzione di TNF α , conferisce rilevanza medico-legale a questi elementi, soprattutto per la rapidità della comparsa nei tessuti di tale popolazione cellulare²⁴ e per la scarsa presenza di mast cellule e TNF α nelle lesioni post-mortali.⁸

1.1 Impiccamento e meccanismi di produzione del solco cutaneo

L'impiccamento consiste in una modalità suicidaria produttiva di asfissia meccanica acuta che si verifica per compressione della vie respiratorie da parte di mezzi quali corde, lenzuola, fili metallici ed elettrici, asciugamani, sciarpe, che con un estremo circondano la circonferenza del collo e con l'altro vengono fissati ad un sostegno posto ad un'altezza utile e che risulti, ad impiccamento avvenuto, in posizione superiore al corpo. In tal caso, il mezzo stringente può esercitare un'azione costringitiva sugli organi del collo sia stringendo il cappio (qualora sia fissato con nodo scorsoio), sia grazie alla forza di gravità che pone in tensione e comprime con la sua ansa le strutture aeree, vascolari e nervose del collo.

Gli effetti lesivi del laccio si possono realizzare anche solo con il gravame di un terzo del peso corporeo e, quindi, anche quando il soggetto attua la costrizione del collo assumendo al termine dell'azione una posizione semisospesa, seduta o semi-seduta. In questi casi, la mancanza da parte del soggetto di istintivi tentativi volti alla rimozione del laccio, trovano spiegazione nella immediata perdita di coscienza che consegue alla stasi sanguigna ed all'ipo-afflusso ematico cerebrale.

Nel 1876 Hofmann arrivò alle seguenti conclusioni: per l'occlusione delle vene giugulari esterne è sufficiente una forza di trazione di circa 2 Kg; per l'occlusione delle arterie carotidi comuni e delle vene giugulari interne è necessaria una forza di trazione di 5 Kg; per occludere la trachea occorre l'applicazione di una forza di trazione pari a circa 15-16 Kg e circa 30-32 Kg sono necessari per l'occlusione del circolo vertebrale.

Pertanto, la dinamica della fisiopatologia asfittica è caratterizzata dal concorso simultaneo o successivo, costante o eventuale, di tre determinismi lesivi, quello di natura propriamente asfittica, quello di natura circolatoria e quello di natura nervosa.

Infatti, i meccanismi di costrizione, trazione, compressione e stiramento delle strutture del collo possono comportare un impedimento diretto del flusso d'aria attraverso le vie respiratorie per compressione delle stesse a causa del sollevamento verso l'alto ed all'indietro dell'osso ioide e della base linguale e la conseguente compressione del palato molle ed occlusione del faringe.

Inoltre, può verificarsi una ostruzione per stiramento delle vene giugulari e delle arterie carotidi, produttiva di stasi cerebrale per ostacolato reflusso ematico, perdita di coscienza e progressivo arresto della circolazione cerebrale. Tali fenomeni possono essere più o meno rapidi a seconda che l'azione compressiva provochi anche l'ostruzione della rete vascolare delle arterie vertebrali.

Il laccio, altresì, può esercitare a livello del collo un'azione compressiva e di stiramento sulle aree riflessogene del seno carotideo e del nervo vago, la cui stimolazione può indurre un meccanismo riflesso inibitorio, produttivo di arresto cardiocircolatorio.

Il quadro lesivo dell'impiccamento è dominato dalla lesione cutanea locale ecchimotico-escoriata, prodotta dall'azione del laccio sul collo, denominata solco.

Il solco cutaneo è rappresentato da una depressione lineare, più o meno infossata, il cui aspetto varia a seconda del materiale di cui è costituito il laccio. Infatti, si possono distinguere solchi molli o duri a seconda dell'azione escoriante esercitata dallo stesso.

Il solco molle è dovuto all'azione di mezzi soffici che non provocano un'azione di escoriazione sulla cute (come ad esempio una calza in nailon o una sciarpa di seta), per cui l'essiccamento è certamente meno intenso. Generalmente non è presente infiltrazione ematica ed il solco assume un cromatismo giallastro. Talvolta può essere caratterizzato da un margine inferiore pallido, in contrasto con il margine superiore di cromatismo rossastro, fenomeno conseguenza di congestione post- mortale.

Il solco duro, prodotto da un laccio ruvido e dotato di azione escoriativa (come ad esempio una corda di canapa), ha cromatismo brunastro, aspetto scabro, secco e consistenza coriacea per l'essiccamento che subisce la cute dopo aver perso lo strato corneo a seguito della trazione e dell'abrasione subita. Il solco duro prodotto da corde ruvide fra loro intrecciate, causa la formazione di vescicole cutanee e piccole emorragie determinate dalla compressione della cute fra le volute della corda stessa.

I caratteri del solco da impiccamento sono rappresentati da: direzione obliqua, discontinuità e differente profondità.

Il solco è obliquo rispetto all'asse trasversale del collo, trovandosi in posizione più bassa nel tratto corrispondente al pieno dell'ansa della corda e in posizione più alta a livello del nodo. L'orientamento del solco è dall'avanti all'indietro e dal basso verso l'alto nelle forme di impiccamento tipico (il pieno dell'ansa cinge la superficie anteriore del collo ed il nodo scorsoio è situato in posizione diametralmente opposta, in sede occipitale), con altro orientamento, ma pur sempre obliquo e ascendente nelle forme atipiche (il nodo scorsoio si viene a trovare nelle regioni anteriori o laterali del collo o del capo ed il pieno dell'ansa in sede controlaterale).

Il solco è discontinuo perché esso non forma un giro completo intorno al collo, ma si interrompe in corrispondenza del nodo dove il laccio, per la forza di trazione, si discosta dal collo stesso senza esercitare azione di compressione in quel tratto limitato; talvolta la discontinuità è conseguenza dell'interposizione tra il piano cutaneo ed il laccio di piani di protezione rappresentati ad esempio da capi di vestiario.

Il solco presenta profondità differente perché la compressione dei tessuti molli del collo non è uniforme su tutta la circonferenza del collo. Infatti, si apprezza una profondità maggiore, a causa del maggior peso del corpo nel punto di sospensione, in corrispondenza del pieno dell'ansa e diminuisce man mano che si avvicina al nodo scorsoio, dove il solco si interrompe. La profondità sarà maggiore nel caso di lacci di piccolo diametro, in ragione della loro maggiore capacità di penetrazione. Qualora il mezzo sia tenacemente adeso alla cute, il solco appare continuo, ciononostante presenta diversa profondità nei suoi vari tratti ed in corrispondenza del nodo forma un angolo a "V" rovesciata.

La localizzazione è al di sopra della cartilagine tiroidea.

Nei casi in cui si dovesse riscontrare un solco sito più in basso si deve argomentare che la cute, dopo essersi spostata verso l'alto durante l'impiccamento, ritorna alla posizione originaria una volta rimosso il cadavere.

In genere, quindi, il solco cutaneo nei casi di impiccamento è unico, discontinuo sul nodo, di profondità variabile, con fondo ad aspetto pergamenaceo, localizzato più frequentemente al di sopra della cartilagine tiroidea ed avente un orientamento obliquo.

In sede di esame esterno, nel contesto del solco è possibile osservare la presenza di creste o punteggiature emorragiche e vescichette sierose o sieroematice che dimostrerebbero la vitalità della lesione, elemento utile per porre diagnosi differenziale tra impiccamento e sospensione di cadavere. Queste lesività si determinano soprattutto quando il laccio presenta caratteristiche di ruvidezza e si compone di più lacci fra loro attorcigliati (corde di canapa ad esempio).

In caso di impiccamento attuato con avvolgimento multiplo del laccio, si possono formare solchi circolari e completi, duplicati secondo i giri della corda, mentre l'ultima voluta può lasciare un'impronta obliqua ed interrotta all'altezza del nodo. Le regioni di cute situate tra i solchi doppi si sollevano in pieghe, formando piccole creste escoriate e coperte da crosticine ematiche.

1.2 Indagini istologiche ed immunoistochimiche della cute del solco

Le indagini istologiche richiedono il prelievo di un tratto di cute di lunghezza pari a circa 1-2 cm, orientato perpendicolarmente rispetto all'andamento del solco e che comprenda regioni di cute sana sopra e sottostante rispetto al solco, giungendo in profondità sino al tessuto adiposo

sottocutaneo.

Il quadro istologico è caratterizzato da assottigliamento dello strato epidermico, in corrispondenza del passaggio tra cute sana e solco, conseguente all'appiattimento dello strato corneo in seguito all'azione di compressione esercitata dal laccio; strato epidermico con distacco, in talune regioni, dello strato corneo, maggiormente evidente in caso di nodi scorsoi che causano un maggiore azione di sfregamento del laccio sulla cute; cellule degli strati epidermici più profondi per lo più orientate nel medesimo verso, con asse maggiore obliquo e nuclei ravvicinati tra loro, con note di picnosi ed ipercromia; appiattimento delle digitazioni inter-papillari; scollamenti dermo-epidermici; derma tendenzialmente basofilo con fasci fibrosi compressi; congestione lungo il margine superiore ed inferiore del solco; talora infiltrati emorragici dermici superficiali a livello dell'ipoderma e dei muscoli pelliciai.

Peculiare reperto sembra essere la presenza di vacuoli otticamente vuoti in alcuni vasi venulari e capillari, presenti in corrispondenza delle regioni superficiali e profonde del derma, nonché a livello della cute indenne posta a livello del bordo del solco; tale quadro anatomo-patologico, con molta verosimiglianza riconducibile a fenomeni di microembolizzazione lipidica, è associato a modesti gradi di embolia polmonare e, quindi, potrebbe assumere significato di reazione vitale.

Nei casi di impiccamento prodottosi mediante l'esecuzione di più volute del laccio intorno al collo o in cui è stato impiegato un laccio del tipo corda ritorta, la presenza di creste emorragiche a livello della cute sana determina, microscopicamente, la formazione di emorragie puntiformi in corrispondenza del derma.

Le vescichette sierose, presenti sulla cute interposta tra i due solchi, si localizzano, a livello microscopico, nello strato subepidermico, tra le papille dermiche e lo strato basale epidermico e/o in sede intraepidermica, situate cioè al di sotto dello strato corneo o all'interno di esso. Il contenuto risulta costituito da materiale liquido eosinofilo e/o da vacuoli otticamente vuoti corrispondenti a gocce lipidiche. I corpi papillari del derma presentano piccole fessure o vere e proprie vescichette con contenuto simile.

Prima di esporre le tecniche di immunoistochimica applicate ai preparati istologici di cute del solco, si precisa che, per lesioni cutanee prodotte dall'azione di un laccio mediante meccanismo di impiccamento, la rapidità con cui si verifica il decesso determina alterazioni tissutali che vengono comprese nelle fasi precoci della risposta infiammatoria.

Sinteticamente, un danno alla barriera epidermica, provoca una precoce liberazione di citochine quali IL-1 e TNF α a partire anche dai cheratinociti stessi, cui segue l'aggregazione piastrinica, l'infiltrazione dei tessuti da parte di isolati leucociti neutrofili, l'iniziale degranulazione

delle mast cellule e la liberazione di fattori di crescita quali EGF, PDGF, TGF- β . Solo successivamente, si verifica il differenziamento dei monociti in macrofagi (a loro volta richiamati in prossimità della lesione dalla liberazione della chemochina IL-8), con rilascio da parte di questi ultimi delle citochine IL-1 e IL-6 e dei fattori di crescita FGF, EGF, TGF- β e PDGF²⁸.

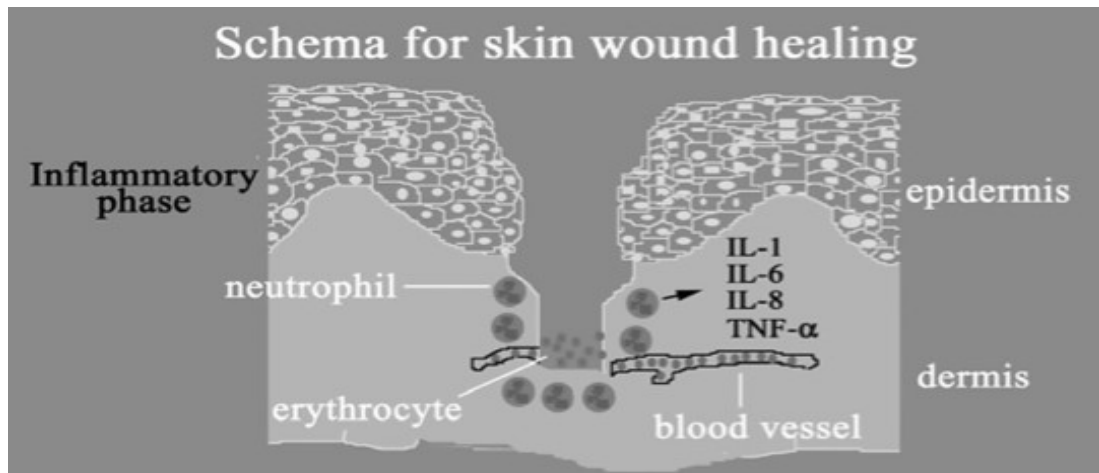


Figura 1.1 Fase infiammatoria nella risposta della cute all'insulto lesivo. (Figura da: Kondo T. Timing of skin wounds. *Legal Medicine* 9:109-114, 2007).

Accanto alla liberazione di citochine, chemochine e fattori di crescita, si ricorda nuovamente che il traumatismo cutaneo determina l'incremento dell'espressione di fibronectina, proteina che supporta l'adesione cellulare e la migrazione di fibroblasti, dei cheratinociti e delle cellule endoteliali, la cui espressione si apprezza a partire da 10-20 minuti dalla produzione della lesione.

Il reclutamento dei leucociti in corrispondenza del sito di lesione è determinato dall'interazione dei leucociti con le cellule endoteliali, attraverso l'espressione di proteine di superficie quali selectine P (tendono a presentarsi anche 1 minuto dopo l'insorgenza della lesione), selectine E (si positivizzano dopo 1 ora dalla comparsa della lesione), ICAM-1 e VCAM-1 (si positivizzano da 1 a 3 ore dalla comparsa della lesione)²⁹.

Si ricorda che, analisi quantitative volte alla ricerca delle citochine pro- infiammatorie interleuchina-1 β (IL-1 β), interleuchina-6 (IL-6), fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), hanno evidenziato un incremento della concentrazione di IL-1 β e di TNF- α nelle lesioni per cui si verificata una sopravvivenza superiore a 15 minuti, nonché un incremento della concentrazione di IL-6 in caso di tempo trascorso dalla formazione della lesione superiore a 20 minuti. La reattività per questi markers può essere utile per il determinismo della vitalità delle lesioni, in particolare per quelle che si instaurano in tempi molto rapidi e che non consentono la migrazione della componente

²⁸ Kondo T. Timing of skin wounds. *Legal Medicine* 9:109-114, 2007.

²⁹ Kondo T., Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Science International* 203: 93-98, 2010.

cellulare leucocitaria, che generalmente si rende marcata a distanza di circa 1-2 ore dall'applicazione della forza traumatica.

Pertanto, nel caso del solco cutaneo prodotto in corso di impiccamento, la liberazione di citochine-chemochine da parte delle cellule presenti in corrispondenza dei tessuti (cellule epiteliali, stromali ed endoteliali), rappresenta il precoce meccanismo difensivo messo in atto dai tessuti dell'organismo, che provoca la migrazione di altre popolazioni cellulari leucocitarie dal lume vasale sino all'area sottoposta a lesione traumatica.

Tali modificazioni cellulari e molecolari legate alla fase infiammatoria hanno portato, attraverso indagini immunohistochimiche, allo studio di citochine TNF α , IL- 8, IL-6, IL-10, MCP-1, IL-15, IL-1 β prodotte in corrispondenza del sito lesionato (Tabella 1.4), nonché di molecole glicoproteiche espresse sulla superficie delle popolazioni leucocitarie quali CD45, CD4, CD3, CD8, CD68, CD 20, CD15.

Nome	Cellule produttrici	Cellule bersaglio
IL-1β	Macrofagi, cellule dendridiche, cellule endoteliali	Linfociti T helper, linfociti B, altre cellule
IL-6	Macrofagi, cellule T helper	Cellule plasmatiche, linfociti B e altre cellule
IL-8	Midollo osseo, cellule stromali timiche	Neutrofili
IL-10	Linfociti T helper	Macrofagi, cellule presentanti l'antigene (APC)
TNFα	Macrofagi, cellule epiteliali	Cellule neoplastiche, polimorfonucleati, macrofagi
IL-15	Monociti, macrofagi, cellule dendridiche, cellule epidermiche, fibroblasti, cellule stromali del midollo osseo	Cellule NK, monociti, macrofagi, neutrofili, eosinofili, mast cellule, linfociti T, linfociti B
MCP-1	Cellule endoteliali, fibroblasti, cellule epiteliali, cellule muscolari, monociti, e altre cellule del sistema nervoso	Monociti/macrofagi

Tabella 1.4 Popolazioni cellulari produttrici e bersaglio delle citochine e delle chemiochine indagate attraverso tecniche di immunohistochimica.

I risultati hanno riscontrato un'elevata espressione di IL-15 poiché tale molecola, oltre a determinare un'azione di attivazione sulle cellule T, agisce come una citochina pro-infiammatoria ed induce le cellule della linea monocito/macrofagica a secernere fattori chemiotattici per neutrofili e monociti (IL-8 e MCP-1). L'incremento dell'espressione tissutale di IL-15, soprattutto in sede perivasale dermica e diffusamente in corrispondenza dell'ipoderma, trova spiegazione nel

sinergismo di questa citochina con i granulociti neutrofili, poiché ne promuove la loro precoce attivazione. Infatti, l'IL-15 può indurre la fagocitosi, il riarrangiamento citoscheletrico, l'espressione genica, la sintesi proteica ed il ritardo dell'apoptosi nei neutrofili, richiamati in corrispondenza dei tessuti lesionati.

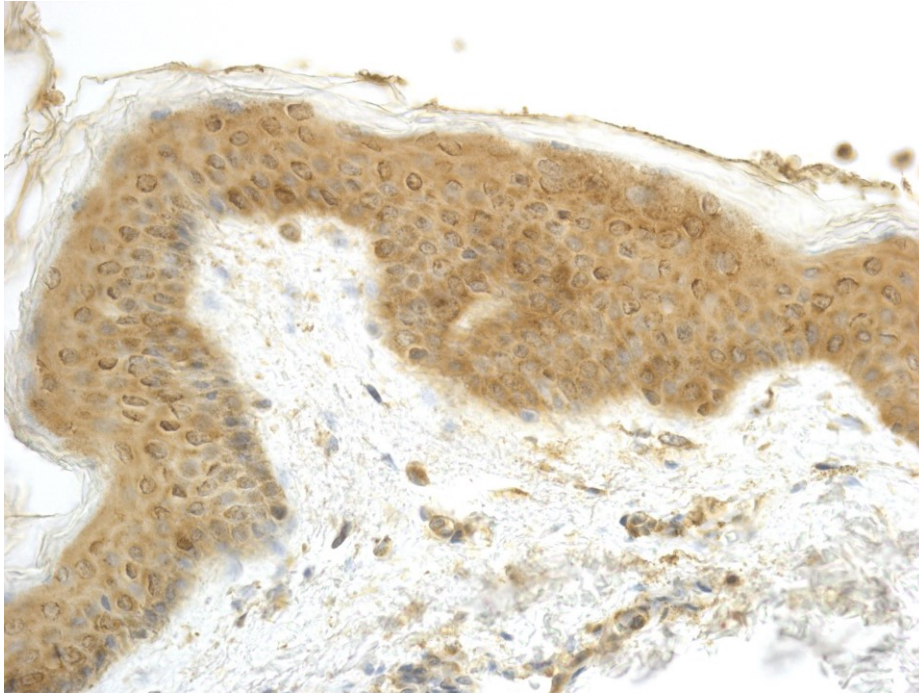


Figura 1.2: espressione di IL-15 nella cute del solco.

Inoltre, è stata evidenziata una marcata espressione di IL-1 β soprattutto a carico del tessuto epidermico, in corrispondenza dell'epitelio ghiandolare ovvero dei follicoli piliferi. Tuttavia è doveroso precisare che in questo caso l'indagine è stata eseguita sui tegumenti di cavie mantenute in vita per diversi minuti dopo l'applicazione del mezzo lesivo, consentendo, in tal modo, l'espressione della molecola citata in corrispondenza del tessuto cutaneo. Questo spiega la negatività per la presenza di questa molecola nelle lesioni di solchi cutanei umani.

Per quanto concerne la valutazione le indagini della componente cellulare infiammatoria, si ricorda che i granulociti neutrofili rappresentano la prima popolazione cellulare che migra dalla circolazione ematica ai tessuti della cute in seguito alla stimolazione chemochinica e citochinica determinata dall'insulto lesivo. Infatti, reazioni istologiche positive per la presenza di granulociti neutrofili (più di 10 cellule), si sono evidenziate in corrispondenza di lesioni cutanee che avevano un tempo di produzione che si assestava intorno ai 20-30 minuti e questo elemento trova riscontro nella marcata produzione di IL-15 a livello tissutale come detto in precedenza.

Pertanto, lo studio delle cellule legate alla risposta infiammatoria ha suggerito la ricerca

delle molecole quali CD45 (antigene comune della popolazione cellulare leucocitaria), CD3 (TCR - T cell receptor-), CD4 (linfociti T helper), CD8 (linfociti T citotossici), CD15 (neutrofilo), CD20 (linfociti B), CD68 (macrofagi).

L'indagine ha consentito di evidenziare un aumento dell'espressione di CD15 (antigene di superficie dei neutrofilo), in regione perivasale, in corrispondenza delle strutture vascolari dermo-ipodermiche (seppur di ridotta entità proprio per la sopravvivenza breve delle vittime sottoposte al meccanismo dell'impiccamento), non trovandosi una corrispondenza per quanto concerne le sezioni di cute non lesionata.

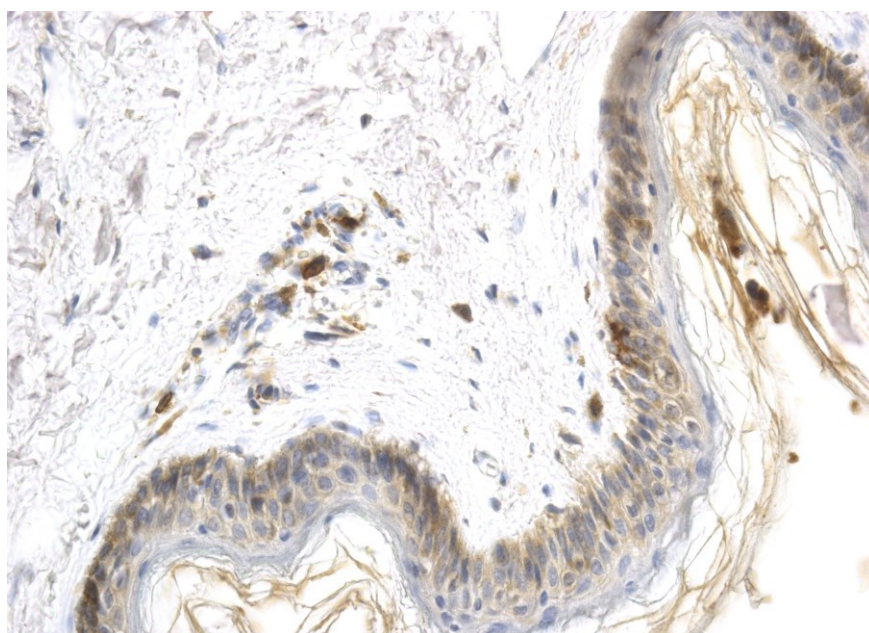


Figura 1.3: espressione di CD15 nella cute del solco

Oltre alla componente cellulare neutrofila, assume importanza un'altra popolazione cellulare: le mast cellule. Infatti, in caso di lesioni cutanee si assiste ad un incremento della concentrazione tissutale di istamina, i cui livelli aumentano significativamente in un tempo compreso tra i 5 minuti e le 3 ore rispetto alla produzione della lesione. Inoltre, si assiste ad un aumento nell'attività enzimatica mastocitaria (triptasi e chimasi), significativamente aumentata per lesioni prodotte meno di un ora prima del decesso, raggiungendo il picco massimo in quelle prodotte tra l'una e le tre ore prima rispetto all'*exitus*. L'accumulo dell'enzima triptasi nelle lesioni del solco denota un'intensa attività mastocitaria, particolarmente accentuata in regione epidermica, lungo la parete dei vasi dermici, nonché in corrispondenza dello stroma perighiandolare.

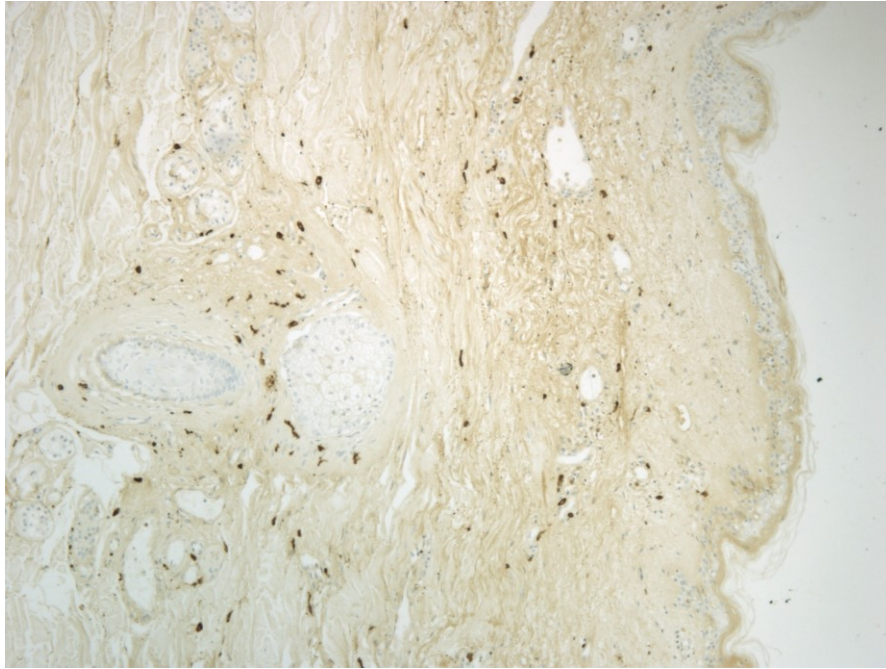


Figura 1.4: espressione della triptasi nella cute del solco.

Sempre connessa all'attività mastocitaria risulta la produzione della citochina pro-infiammatoria TNF- α , tuttavia, nel caso di queste lesioni cutanee, la negatività immunoistochimica evidenziata per tale molecola nelle lesioni cutanee da solco risiede nella rapidità con cui si verificano i meccanismi che conducono all'*exitus*, per cui viene dimostrato un incremento nella sua espressione tra 30 e 60 minuti della formazione della lesione rispetto al decesso.

Concludendo, in caso di lesioni cutanee provocate attraverso i meccanismi di compressione, trazione e stiramento prodotti dall'azione traumatica del laccio sui tessuti del collo in corso di impiccamento, la vitalità delle lesioni è determinata dal riscontro di reperti macroscopici quali punteggiature emorragiche e vescichette sierose.

Questi reperti si integrano con le risultanze delle indagini istologiche, che nelle lesioni vitali presentano: assottigliamento dello strato epidermico in corrispondenza del passaggio tra cute sana e solco; distacco di talune regioni di strato corneo dagli strati epidermici sottostanti; cellule degli strati epidermici più profondi orientate nel medesimo verso e nuclei ravvicinati, picnotici ed ipercromici; appiattimento delle strutture papillari dermiche; scollamenti dermo-epidermici; compressione dei fasci fibrosi dermici; congestione vasale al margine superiore ed inferiore del solco; infiltrati emorragici dermo-ipodermici e dei muscoli pellicciai. Talora è possibile rilevare tracce di microembolizzazione all'interno dei vasi, nonché vescicole contenenti materiale eosinofilo ovvero otticamente vuote in sede intraepidermica, dermo-epidermica nonché dermica.

Le indagini immunoistochimiche hanno consentito di documentare la vitalità delle lesioni da solco da impiccamento come caratterizzate da marcato incremento dall'espressione di IL-15

(citochina pro-infiammatoria responsabile del reclutamento e dell'attivazione dei neutrofili), incremento dell'espressione di CD15 (molecola di superficie presente sui neutrofili), aumento dell'attività della triptasi delle mast cellule (istologicamente questa si presenta con "aloni" in sede epidermica, dermica, perivasale ed in corrispondenza dello stroma perigliandolare).

2. MicroRNA: caratteristiche e funzione

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA non codificante, di lunghezza pari a 19-22 nucleotidi, che nell'ultimo decennio sono entrati a far parte del complesso circuito della biologia molecolare, rivelando un ruolo chiave come modulatori dell'espressione genica³⁰ a livello post-trascrizionale.

Le molecole di RNA non codificanti e presenti nelle cellule degli eucarioti, in base alla loro lunghezza ed all'associazione con proteine della famiglia Argonauta (AGO), sono state classificate in: miRNA (microRNA), siRNA (small interfering RNA), piRNA (PiwiRNA)³¹, rasiRNA (repeat associated small interfering RNA) e ncRNA (longer non-coding RNA).

I miRNA e i siRNA sono simili sia dal punto di vista biochimico che funzionale: entrambi sono lunghi 19-20 nucleotidi (nt), possiedono un'estremità 5'- fosfato e una 3'-idrossile e sono parte del complesso di spegnimento indotto dall'RNA (RISC), che ha funzione di inibire l'espressione di uno specifico gene.

Tuttavia, queste molecole si distinguono per la loro origine: i miRNA derivano da una regione a doppio filamento lunga 60-70 nt, mentre i siRNA da lunghe molecole di RNA a doppio filamento³². Inoltre, un singolo miRNA può agire su differenti molecole di RNA messaggero, mentre un siRNA ha un'unica molecola di mRNA bersaglio.

I miRNA, nonostante non codifichino proteine, sono caratterizzati da un'elevata specificità tissutale e rivestono un ruolo importante nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica negli eucarioti, in cui vengono espressi, tra l'altro, secondo tempi e modalità strettamente correlate ai vari stadi di sviluppo.

Infatti, è stato dimostrato il ruolo cruciale dei miRNA nella regolazione di importanti processi fisiologici, quali lo sviluppo, la proliferazione³³ ed il differenziamento cellulare. Inoltre,

³⁰ Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843-854, 1993.

³¹ Ha M., Kim V.N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 509–524, 2014.

³² Macfarlane L.A., Murphy P.R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*. Nov;11(7):537-61, 2010.

³³ Poos K., Smida J., Nathrath M., Mugg D., Baumhoer D., Korsching E. How MicroRNA and Transcription Factor Co-regulatory Networks Affect Osteosarcoma Cell Proliferation. *Plos Computational biology*.

sono coinvolti nella regolazione dei meccanismi apoptotici³⁴ e nei processi di trasduzione del segnale in risposta a stimoli extracellulari, anche di natura stressogena, essendo implicati anche nel controllo dalla risposta immunitaria innata ed adattativa³⁵.

I geni che codificano per i miRNA rappresentano approssimativamente l'1% del genoma umano e ognuno possiede sequenze in centinaia di differenti geni bersaglio: è stato stimato, infatti, che circa il 30% dei geni sono regolati da almeno un miRNA³⁶.

Ad oggi sono stati individuati circa 1900 miRNA umani, come riportato dal database dei microRNA, miRBase (<http://www.mirbase.org>).

La maggior parte dei geni che codificano per i miRNA hanno isoforme multiple (paraloghi), probabilmente il risultato di fenomeni di duplicazione genica: ad esempio, il genoma umano possiede 12 loci per la famiglia del miRNA *let-7*. I geni paraloghi hanno spesso una sequenza identica nella porzione 5', ossia quella relativa alle posizioni nucleotidiche 2-7. Poiché questi sei nucleotidi '*seed sequence*' sono cruciali per l'appaiamento con l'mRNA bersaglio, si pensa che i geni paraloghi agiscano in maniera ridondante. In realtà, essendo anche la porzione 3' dei miRNA importante per l'appaiamento con l'mRNA bersaglio, e poiché questi miRNA hanno spesso pattern di espressione differenti, membri della famiglia con la stessa '*seed sequence*' possono avere ruoli distinti *in vivo*³⁷.

Approssimativamente il 50% dei loci dei miRNA risultano collocati in stretta vicinanza con altri miRNA e, spesso, questi cluster di miRNA sono trascritti come singola unità trascrizionale policistronica³⁸.

I geni dei miRNA, secondo l'organizzazione genomica, possono essere intergenici o intragenici. I geni miRNA intergenici hanno unità trascrizionali (TU) indipendenti, non codificanti, in cui promotore, sequenza di trascrizione e regioni di terminazione non si sovrappongono con altri geni.

I miRNA intragenici sono localizzati entro sequenze di trascrizione, all'interno di regioni introniche o esoniche, e sono definiti geni ospiti. Approssimativamente il 40% dei loci dei miRNA

³⁴ Wojcicka A., Swierniak M., Kornasiewicz O., Gierlikowski W., Maciag M., Kolanowska M., Kotlarek M., Gornicka B., Koperski L., Niewinski G., Krawczyk M., Jazdzewski K. Next generation sequencing reveals microRNA isoforms in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* Volume 53, 208–217, 2014.

³⁵ Sharma N., Verma R., Kumawat K.L., Basu A., Singh S.K. miR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 strain infection in human microglial cells. *J Neuroinflammation* 12(1):249, 2015.

³⁶ Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297, 2004.

³⁷ Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., Jaenisch, R., Sharp, P.A., and Jacks, T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*, 132: 875-886, 2008.

³⁸ Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., and Kim, V.N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J*, 21: 4663-4670, 2002.

sono localizzati in regioni introniche di unità trascrizionali non codificanti, mentre il 10% è situato in regioni esoniche (Figura 2.1).

L'espressione dei miRNA è regolata da fattori di trascrizione, ma anche da altri miRNA, espressi in risposta a stimoli di diversa natura, esogeni ed endogeni (ad esempio, proteine come HnRNPA1, MSAD1, SMAD5 che sono capaci di interagire con i precursori dei miRNA influenzandone il processo di maturazione).

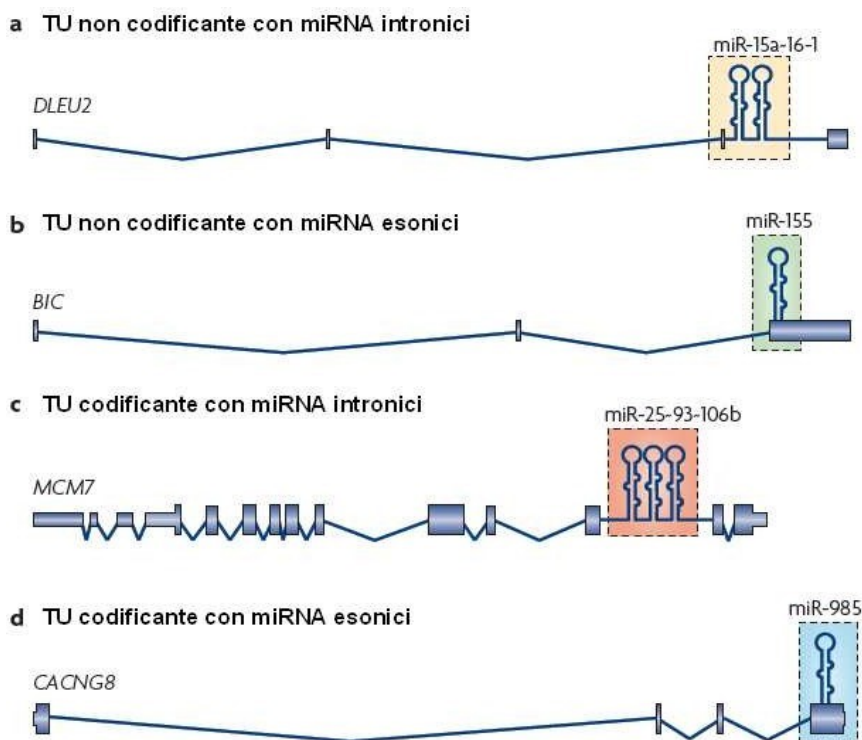


Figura 2.1. Localizzazione genomica dei microRNA. (Figura estrapolata dall'elaborato: Kim V.N., Han, J., and Siomi, M.C. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol, 10: 126-139, 2009.

I miRNA vengono codificati a partire da sequenze promotoriali sotto forma di lunghi trascritti primari chiamati *primary miRNA* (pri-miRNA), dalla RNA polimerasi II e dalla RNA polimerasi III. Tali molecole, come gli mRNA, sono poliadenilati all'estremità 3' e legano una 7-metilguanossina all'estremità 5'³⁹.

I pri-miRNA sono molecole di RNA a singolo filamento che si ripiegano fino a formare una parziale doppia elica cui segue l'appaiamento di sequenze di basi complementari. La struttura dei pri-miRNA è quindi quella di una "forcina" (*stem-loop*) da cui origineranno i pre-miRNA (Figura 2.2)⁴⁰.

³⁹ Blahna M.T., Hata A. Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. FEBS Letters Volume 586, Issue 14, pagine 1906–1912, luglio 2014.

⁴⁰ Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 116: 281-297, 2004.

All'interno del nucleo, i pri-miRNA vengono processati dall'enzima RNA- endonucleasi di tipo III (Drosha), che porta alla formazione di miRNA precursori (pre-miRNA), strutture a "forcina" della lunghezza di 70-100 nucleotidi (azione di 'cropping'). In molti casi, un singolo pri-miRNA contiene un cluster di diversi miRNA e sarà responsabile dell'origine di molteplici sequenze di microRNA (Figura 2.2).

Il riconoscimento della sequenza nucleotidica da parte di Drosha necessita dell'interazione di questo enzima con una seconda proteina denominata Pasha (Partner of Drosha) o DGCR8 (*DiGeorge critical region*), che a sua volta stabilizza l'associazione di Drosha con il pri-miRNA. Pasha interagisce con il complesso descritto riconoscendo la struttura secondaria della base della "forcina" e sequenze di basi poste in prossimità della regione 5' (Figura 2.2)^{41,42}. Sebbene Drosha e DGCR8 rappresentino il core del microprocessore, questo complesso è caratterizzato da altre proteine, quali la elicasi DEAD-box o p68 (nota anche come DDX5) e la p72 (DDX17) che, se inibite nella loro espressione, conducono a morte embrionale.

I pre-miRNA vengono attivamente traslocati dal nucleo cellulare al citoplasma, attraverso l'azione sinergica di Ran-GTP e proteina Exportin-5 (Figura 2.2).

Una volta nel citoplasma, i pre-miRNA vengono processati da un'altra RNA- endonucleasi di tipo III, chiamata Dicer, che genera un doppio filamento (dsRNA) della lunghezza di circa 22 paia di nucleotidi (azione di 'dicing'). Delle molecole di RNA a doppia elica, indicate come miRNA:miRNA*, solo filamento miRNA, denominato filamento guida, viene incorporato nel complesso proteico noto come "*RNA-Induced Silencing Complex*" (RISC). La selezione di uno o dell'altro filamento avviene in base alle sue proprietà termodinamiche: il filamento meno stabile all'estremità 5' è quello che di solito viene selezionato (Figura 2.2).

A tal punto, il filamento guida (miRNA) complessato al RISC, si lega alla proteina Ago (la più conosciuta è la proteina Ago2), ed andrà a costituire il miRNA maturo, mentre l'altro filamento (filamento passeggero o miRNA*) sarà sottoposto a degradazione da parte dell'enzima elicasi (Figura 2.2)⁴³. Tuttavia, in alcuni casi, entrambi i filamenti possono agire come miRNA con target differenti, perciò sono indicati con 5p o 3p a seconda del braccio del precursore da cui originano.

All'interno del complesso proteico del RISC il filamento di miRNA maturo può appaiarsi a sequenze complementari presenti nella regione 3'UTR del filamento di RNA messaggero (mRNA), regolandone così l'espressione genica a livello post- trascrizionale.

⁴¹ Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V.M. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425: 415-9, 2003.

⁴² Yeom K.H., Lee Y., Han J., Suh M.R., Kim V.N. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res*, 34: 4622-9, 2006.

⁴³ Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297, 2004.

Il silenziamento post-trascrizionale dell'mRNA bersaglio è dovuto ai componenti del complesso RISC attivato dall'appiamento miRNA/mRNA. I componenti proteici di questo complesso sono membri della famiglia Agonauta (Ago), costituiti da un dominio PAZ (Piwi Argonaute Zwiller), coinvolto nel legame con il miRNA, ed un dominio PIWI, implicato nel taglio⁴⁴.

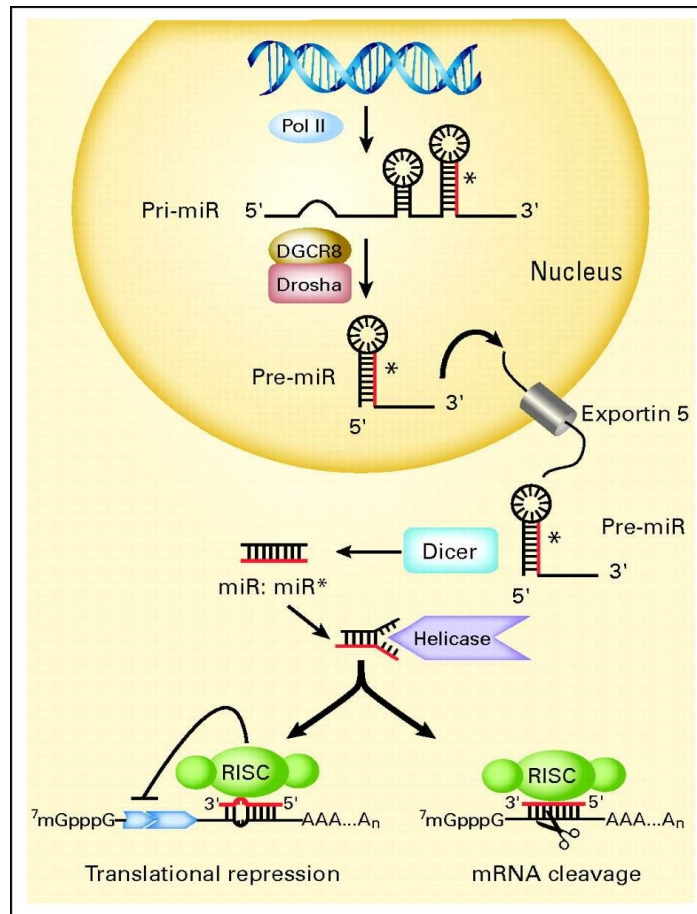


Figura 2.2 Biogenesi, processazione e maturazione dei microRNA (miR).

La regolazione da parte dei miRNA avviene attraverso differenti meccanismi d'azione che variano a seconda della complementarità della basi tra il miRNA ed il suo sito bersaglio: degradazione post-trascrizionale delle proteine; repressione della traduzione durante la fase di allungamento; distacco prematuro dei ribosomi che determina la fine della trascrizione; inibizione dell'inizio della traduzione (Figura 2.3); degradazione della molecola di mRNA.

⁴⁴ Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J., Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & development*, 20:515–524, 2006.

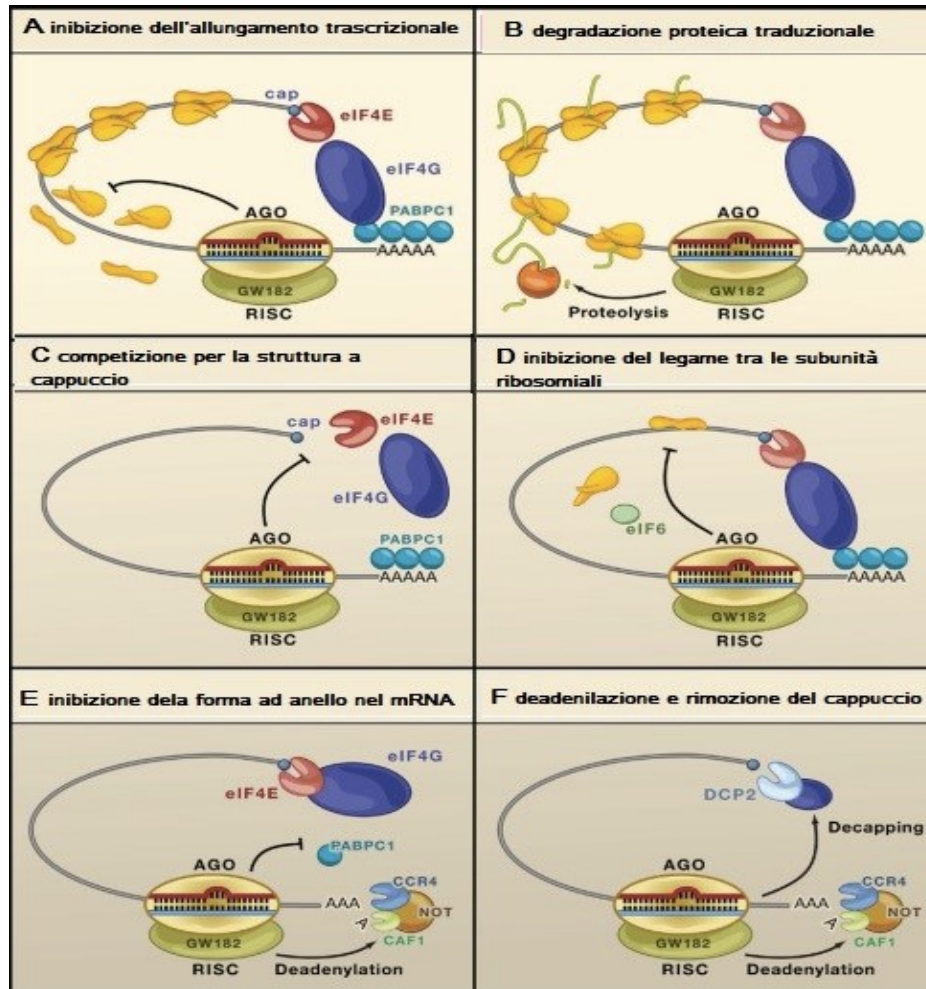


Figura 2.3 Meccanismo di silenziamento genico ad opera dei miRNA. (Figura modificata da Eulalio A., Huntzinger E., Izaurralde E. Getting to the Root of miRNA- Mediated Gene Silencing. Cell. 132(1):9-14, 2008.

Inoltre, i miRNA possono essere trasportati al di fuori delle cellule (miRNA extracellulari) tramite esosomi, microvescicole, corpi apoptotici, proteine che legano l'RNA e HDL, rappresentando una nuova forma di comunicazione intercellulare caratterizzata dal trasferimento di informazioni genetiche da una cellula donatrice ad una effettrice.

Questa forma di trasferimento di informazioni genetiche tra cellule è di rilevanza funzionale poiché può determinare il fenomeno del silenziamento genico nelle cellule riceventi. In questo modo si spiega come un miRNA possa influenzare una popolazione cellulare o un tessuto in cui esso non viene prodotto, o anche come cellule adiacenti all'interno di un organo possano comunicare tra loro. Queste forme di comunicazione sono coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria⁴⁵, nella migrazione cellulare⁴⁶ e nello sviluppo dei tumori⁴⁷.

⁴⁵ Mittelbrunn M., Gutiérrez-Vázquez C., Villarroya-Beltri C., González S., Sánchez-Cabo F., González MÁ., Bernad A., Sánchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen presenting cells. Nat Commun. 2:282, 2011.

I miRNA possono comportarsi da oncosoppressori o da oncogeni (oncomiRNA), questo in relazione al filamento di mRNA a cui si legano. Infatti, possono ridurre l'espressione di geni oncosoppressori, comportandosi da oncogeni, oppure agire su trascritti mRNA oncogenici, comportandosi come oncosoppressori.

L'effetto finale della disregolazione dei miRNA determina, in caso di inattivazione, la sovraespressione dell'mRNA bersaglio, mentre in caso di attivazione dei miRNA si verificherà una down-regolazione dell'mRNA target. Le modificazioni dell'espressione proteica che si realizzano in caso di disregolazione dell'espressione dei miRNA, possono comportare alterazioni dei processi di apoptosi, proliferazione e differenziamento cellulare, nonché interagire con le vie metaboliche coinvolte nei processi di infiammazione ed angiogenesi. In questo modo i miRNA acquisiscono ruolo rilevante nel determinismo di condizioni patologiche quali neoplasie, patologie autoimmuni e patologie cardiovascolari.

2.1 L'espressione dei miRNA nella fase infiammatoria della lesione cutanea

Lo studio dell'espressione e della distribuzione nei tessuti dell'uomo dei miRNA potrebbe essere utile per la comprensione dei meccanismi molecolari che regolano a livello cellulare.

Ad oggi non esiste una banca dati aggiornata relativa alla distribuzione tissutale specifica dei miRNA, in quanto la possibilità di ottenere un database della che rappresenti l'insieme dei miRNA dei tessuti umani dovrebbe basarsi su indagini eseguite su campioni tissutali ottenuti da un unico donatore. Nella realtà lo studio dell'espressione dei miRNA viene eseguito su campioni tissutali (nella maggior parte dei casi patologici), provenienti da differenti donatori, di diversa età e genere.

L'età dei soggetti influisce maggiormente rispetto al sesso come variabile in grado di influenzare l'espressione dei miRNA, soprattutto al di sopra del 60esimo anno di età⁴⁸.

Altri fattori confondenti rendono difficoltosa la possibilità di definire il *pattern* di microRNA espressi in un determinato tessuto, possono porsi in relazione alla natura del campione biologico (le biopsie vengono eseguite generalmente su tessuti patologici); alle modalità di conservazione del campione (la conservazione in formalina al 10% paraffina potrebbe favorire la degradazione della molecola di RNA); infine, in caso di prelievo effettuato da tessuti in corso di autopsia, anche i fenomeni di morte cellulare potrebbero influenzare l'espressione dei miRNA,

⁴⁶ Zhang Y., Liu D., Chen X., Li J., Li L., Bian Z., Sun F., Lu J., Yin Y., Cai X., Sun Q., Wang K., Ba Y., Wang Q., Wang D., Yang J., Liu P., Xu T., Yan Q., Zhang J., Zen K., Zhang C.Y. Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration, *Molecular Cell* 39, 133–144, 2010.

⁴⁷ Yang C., Robbins P.D. The Roles of Tumor-Derived Exosomes in Cancer Pathogenesis, *Clinical and Developmental Immunology*, 2011.

⁴⁸ Meder B., Backes C., Haas J., Leidinger P., Stahler C., Gossmann T., Vogel B., Frese K., Giannitis E., Katus H.A., Meese E., Heller A. Influence of the Confounding Factors Age and Sex on MicroRNA Profiles from Peripheral Blood. *Chinical Chemistry* 60:9, 1200-1204, 2014.

tuttavia vi sono ancora pochi dati in merito alla stabilità di queste molecole dopo il decesso dell'organismo^{49,50}.

Per quanto riguarda la cute, i miRNA hanno un ruolo fondamentale nei processi di proliferazione e di differenziazione cellulare, nei processi che regolano la risposta immunitaria innata ed adattativa in risposta ad insulti traumatici ed infettivi cutanei, così come nei successivi processi di angiogenesi e riparazione tissutale. Pertanto, non è difficile comprendere come alterazioni nella loro espressione possano essere correlate a diverse patologie cutanee quali psoriasi, sclerodermia, dermoatomiosite e neoplasie (melanomi).

I miRNA, inoltre, svolgono un ruolo importante nella regolazione dei processi di autrinnovamento e differenziazione delle cellule staminali della cute a partire dallo strato basale dell'epidermide e migrazione successiva delle cellule differenziate verso gli strati cutanei spinoso, granuloso e corneo.

Infatti, l'inibizione sperimentale dei geni che codificano per le proteine Dicer oppure DGCR8, porta ad una anomala formazione della barriera cutanea con anomalie evidenti a carico dei follicoli piliferi, nonché fenomeni di iperproliferazione dei cheratinociti interfollicolari basali^{51,52}.

Il miR-205-5p è specificamente espresso nella cute, soprattutto nei melanociti, e verosimilmente ha funzione regolatoria del ciclo cellulare, poiché una sua ipoespressione è correlata alla progressione dei melanomi cutanei⁵³.

Alcuni dei miRNA più espressi nella cute sono miR-152, -143, -126, -21, -27a, -214, -16, -203, -125b, -34a, -205, -27b, -30b, 125a, -191, -famiglia -200 (-200a, -200b, -200c), -141, -429, famiglia -199 (-199a, -199b) e famiglia -19/-20 (-19b, -20), -17-5p, -93⁵⁴.

Ad esempio miR-125b reprime la differenziazione delle cellule staminali, mentre miR-203 promuove la differenziazione epidermica e ne limita il potenziale proliferativo inibendo il ciclo cellulare mediante silenziamento di p63 (molecola essenziale per il mantenimento delle cellule staminali nei tessuti epiteliali). Altri nove miRNA (miR-23b, miR-95, miR-210, miR-224, miR-26a,

⁴⁹ Nagy C., Maheu M., Lopez J.P., Vaillancourt K., Cruceanu C., Gross J.A., Arnovitz M., Mechawar N., Turecki G. Effects of post mortem interval on biomolecule integrity in the brain. *J. Neuropathol Exp. Neurol.* 74, 459-469, 2015.

⁵⁰ Lv Y.H., Ma K.J., Zhang H., He M., Zhang P., Shen Y.W., Jiang N., Ma,D. and Chen,L. A time course study demonstrating mRNA, microRNA, 18S rRNA, and U6 snRNA changes to estimate PMI in deceased rat's spleen. *J. Forensic Sci.*, 59, 1286–1294, 2014.

⁵¹ Andl T., Murchison E.P., Liu F., Zhang Y., Yunta-Gonzalez M., Tobias J.W., Andl C.D., Seykora J.T., Hannon G.J., Millar S.E. The miRNA-processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles. *Curr Biol.* 16(10):1041–1049, 2006.

⁵² Yi R., Pasolli H.A., Landthaler M., Hafner M., Ojo T., Sheridan R., Sander C., O'Carroll D., Stoffel M., Tuschl T., Fuchs E. Dgcr8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(2):498–502, 2009.

⁵³ Liu S., Tetzlaff M.T., Liu A., Liegl-Atzwanger B., Guo J. and Xu X. Loss of microRNA-205 expression is associated with melanoma progression. *Lab. Invest.*, 92, 1084–1096, 2012.

⁵⁴ Banerjee J., Sen C.K. MicroRNA in Skin and Wound Healing. *Methods Mol Biol*, 936: 343-356, 2013.

miR-200a, miR-27b, miR-328 e miR-376a), sono stati associati alla differenziazione dei cheratinociti in vitro ed in vivo.

La risposta cutanea ad un insulto traumatico, come già detto nel capitolo precedente, consta di tre fasi che a livello cellulare e molecolare si distinguono in: fase infiammatoria, fase proliferativa e fase di rimodellamento.

La fase infiammatoria è regolata inizialmente da segnali molecolari pro- infiammatori, che determinano il reclutamento di popolazioni cellulari della risposta immunitaria innata in corrispondenza del sito lesionato. In una fase successiva, vengono espressi segnali molecolari volti ad inibire la risposta infiammatoria favorendo i processi cellulari e molecolari propri del rimodellamento e della riparazione tissutale.

I miRNA hanno un ruolo importante nella regolazione della risposta infiammatoria nel sito di lesione, poiché la loro espressione viene regolata dalla produzione di citochine infiammatorie. Essi intervengono con azione inibitoria sulle vie di trasduzione della risposta favorente l'infiammazione, acquisendo un ruolo regolatore della bilancia infiammatoria in senso antiinfiammatorio, andando a contrastare, sin dalle fasi precoci, l'azione delle citochine proinfiammatorie IL-1 β , TNF α e IL-6. Il loro ruolo è dimostrato dal fatto che la disregolazione dei miRNA implicati nella risposta infiammatoria è responsabile della comparsa di patologie cutanee su base autoimmune come psoriasi e dermatiti atopiche⁵⁵.

Il traumatismo a livello cutaneo stimola la produzione di molecole pro- infiammatorie (oppure in caso di microorganismi si verifica l'attivazione di segnali intracellulari derivati da TLR - Toll-like receptors-, NLR -nucleotide-binding domain-like receptors-, RLR -retinoic acid-like receptors-), l'attivazione del fattore di trascrizione NF κ B e la liberazione di IL-6, IL-1 β , TNF α viene stimolata e tali molecole, a loro volta, inducono l'iperespressione di miRNA, quali miR-21, miR146a/b, miR-155 (Figura 2.4).

⁵⁵ Jinnin M. Recent progress in studies of miRNA and skin disease. *Journal of Dermatology*, 42, 551-558, 2015.

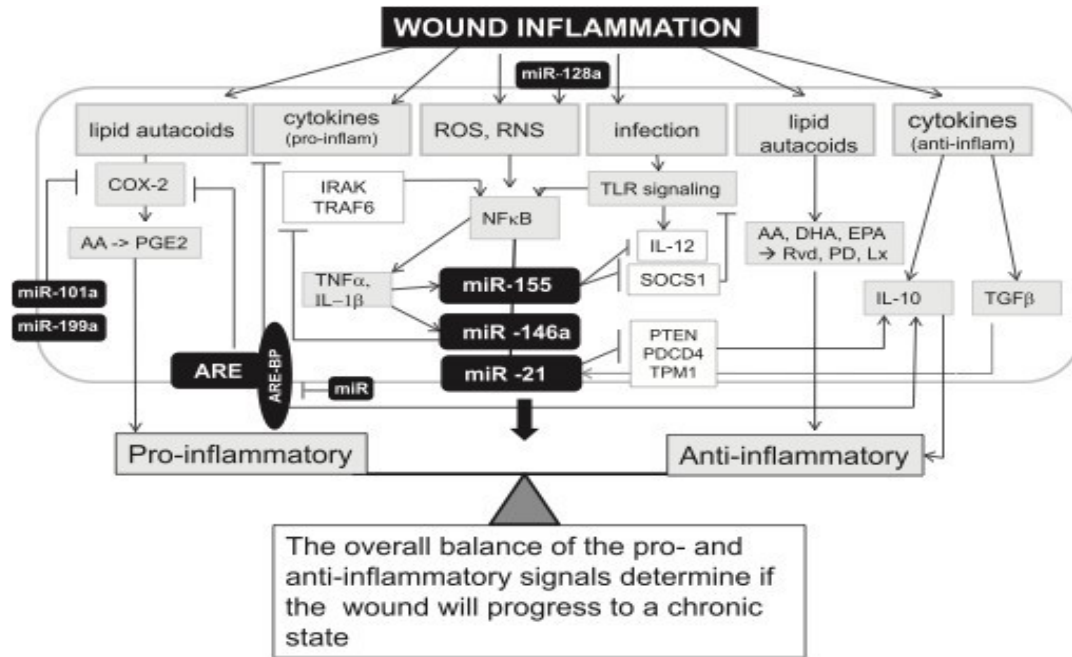


Figura 2.4 Ruolo dei miRNA nella regolazione della risposta infiammatoria (Roy S., Sen C.K. MiRNA in innate immune responses: novel players in wound inflammation. *Physio Genomics* 43: 557- 565, 2011)

Il miRNA-146 consiste in una famiglia di miRNA costituita da due molecole, miR-146a e miR-146b. L'espressione di tali molecole è indotta dalla produzione di citochine infiammatorie quali TNF α e IL-1, a partire da cellule mieloidi e della linea monocitaria e agiscono inibendo la via di trasduzione del segnale IRAK e COX-2. Il miRNA-155 viene prodotto da cellule della linea monocito/macrofagica, nonché da cellule dendritiche (o cellule presentanti l'antigene -APC-), e la produzione è indotta da TNF α e lipopolisaccaride (LPS); agisce silenziando SHIP1, SOCS1 e inibendo la produzione di IL-12. Infine, l'espressione di miRNA-21, indotta dall'IL-6 a partire da cellule della linea monocito/macrofagica e linfociti B e T, agisce inibendo PTEN e PDCD4⁵⁶. Studi di ibridizzazione *in situ* hanno dimostrato che la molecola di miR-21 è espressa nelle ghiandole sebacee, nel tessuto adiposo ipodermico e nel derma, senza essere evidenziato in corrispondenza dell'epidermide.

Dopo l'insorgenza di un traumatismo cutaneo, si evidenzia un incremento nell'espressione di miR-21, soprattutto a carico delle cellule del tessuto epidermico⁵⁷.

Anche il miR-125b-5p è associato alla risposta immunitaria innata, poiché viene iperespresso in seguito alla stimolazione di IFN γ e NF κ B. Questa molecola agisce inibendo IRF4,

⁵⁶ Roy S., Sen C.K. MiRNA in innate immune responses: novel players in wound inflammation. *Physiol. Genomics*, 43, 557-565, 2011.

⁵⁷ Wang T., Feng Y., Sun H., Zhag L., Hao L., Shi C., Wang J., Li R., Ranx X., Su Y., Zou Z. miR-21 Regulates Skin Wound Healing by Targeting Multiple Aspects of the Healing Process. *The American Journal of Pathology*, 181:6, 2012.

promuovendo dell'infiammazione e contemporaneamente inibisce l'enzima 5-lipossigenasi, andando a ridurre la produzione di leucotrieni⁵⁸.

Altri miRNA sono associati ai processi di produzione di citochine, segnali chemotattici e fattori di crescita che inducono la migrazione di leucociti nelle fasi successive dell'insulto lesivo e, successivamente, nella fasi della risposta antinfiammatoria.

La molecola miRNA-124a è implicata nella regolazione post-trascrizionale negativa per l'espressione della chemioquina MCP-1, uno dei più importanti fattori chemiotattici per cellule della linea monocito/macrofagica.

La produzione di TNF α è favorita dalla ipo-espressione di miR-125b, mentre l'espressione di selectina-E e ICAM-1 sono indotte dall'aumento dell'espressione rispettivamente di miR-31 e miR17-3p.

L'IL-10 rappresenta una delle più importanti citochine anti-infiammatorie, che agisce inibendo l'espressione dei geni che codificano per le proteine pro- infiammatorie. L'incremento dell'IL-10 determina una riduzione nell'espressione di miR-155.

Nelle fasi successive rispetto a quella infiammatoria, lo stimolo ipossico induce l'angiogenesi attraverso l'incremento della produzione di miR-200b, mentre la proliferazione, la migrazione e la differenziazione delle cellule endoteliali sono regolate da miR-126, miR-221/222, miR-17-92, miR-92a, miR-20a e miR-17-5p (Figura 2.4).

La riepitelizzazione determina l'iper-espressione del miRNA-210, a sua volta indotto dallo stimolo ipossico poiché direttamente sotto il controllo dei fattori proteici indotti dall'ipossia (HIF1 α e HIF-2 α) e NF κ B (Figura 2.5). La fase di rimodellamento tissutale sembra essere regolata dall'espressione di miRNA-29b, miRNA-29c e miRNA-192, che agiscono regolando i meccanismi volti alla deposizione di collagene ed altre molecole della matrice extracellulare (Figura 2.5).

⁵⁸ Lee H.M., Kim T.S., Jo E.K. MiR-146 e mir-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Rep* 46(6), 311-318, 2016.

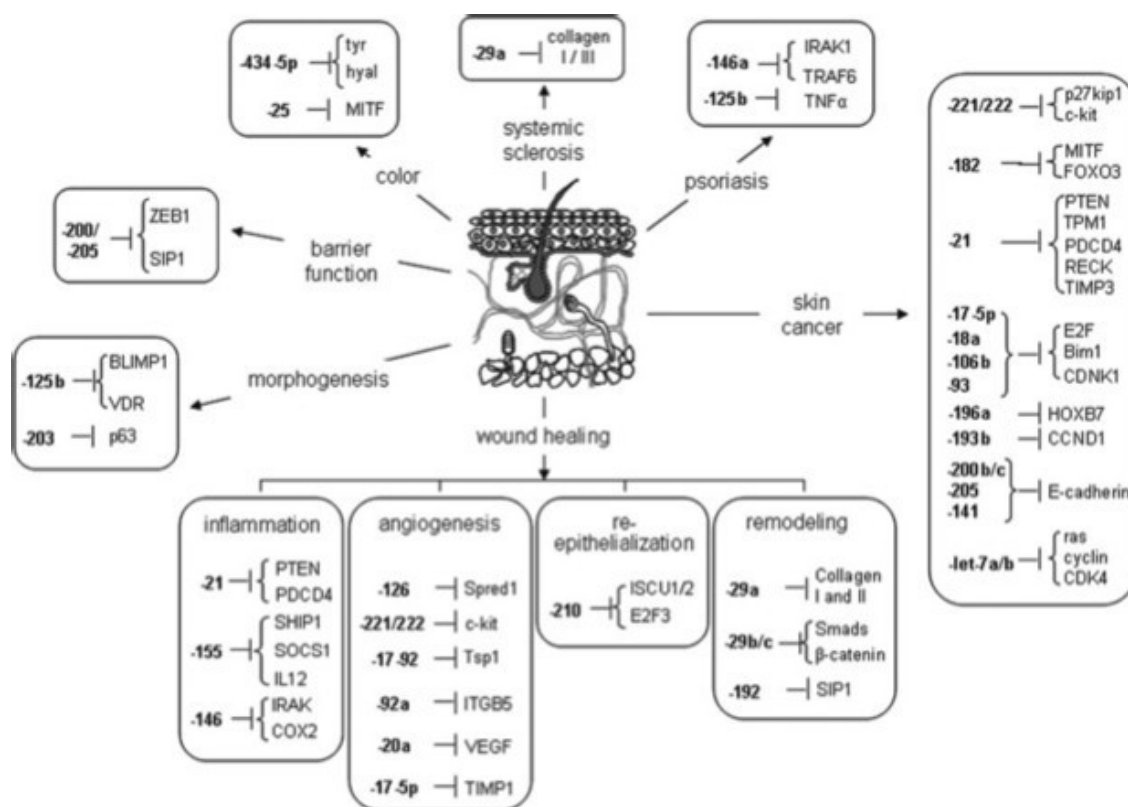


Figura 2.5. MiRNA coinvolti nella morfogenesi cutanea e relativa espressione in corso di patologie della stessa. (Figura estrapolata dall'elaborato: Banerjee J., Sen C.K. MicroRNA in Skin and Wound Healing. *Methods Mol Biol*, 936: 343-356, 2013).

L'espressione di alcuni miRNA quali miR-146, miR-125, miR-155 e miR-21 risulta importante nella regolazione dei processi infiammatori della cute poiché queste molecole, aventi azione inibitoria post-trascrizionale, vengono prodotte a livello locale in seguito ad insulto traumatico ovvero in seguito a penetrazione di microorganismi infettivi. Infatti, l'iperespressione di tali miRNA a livello locale comporta un'inibizione di fattori di trascrizione, citochine e chemiochine ad attività pro-infiammatoria (NFκB, TNFα, IL-1, IL-8), eccezione di miR125b che ha anche azione promuovente l'infiammazione, sin dalle fasi precoci della risposta infiammatoria. In tal modo si previene una disregolazione della bilancia infiammatoria a favore di una risposta pro-infiammatoria eccessiva che, quando si verifica, è responsabile dell'insorgenza di patologie autoimmuni.

L'iperespressione precoce di tali miRNA in caso di insulto lesivo cutaneo (di natura infettiva e non), ha funzione di regolazione della risposta immunitaria innata sin dalle sue fasi precoci, prevalentemente in senso anti-infiammatorio. Tali molecole possono acquisire rilevanza medico-legale, poiché l'espressione precoce dei miRNA attesta l'attivazione dei meccanismi molecolari e cellulari di risposta ad un insulto lesivo della cute e fornisce potenziali elementi utili

per la diagnosi cronologica e di vitalità della lesioni cutanee, soprattutto per quelle che si formano pochi minuti prima (meno di cinque) rispetto all'*exitus*.

3. Protocollo sperimentale

3.1 Obiettivi

La diagnosi di vitalità delle lesioni rappresenta una problematica rilevante poiché nel corso degli accertamenti medico-legali sul cadavere ci si può trovare di fronte alla necessità di stabilire se determinate lesioni (escoriazioni, abrasioni, lacerazioni, fratture ossee, rotture viscerali, etc.), siano state prodotte in vita (lesioni vitali), oppure siano state prodotte dopo la morte (post-mortali).

È noto che non esiste un limite assoluto tra la vita e la morte ed è necessario tenere conto di una serie di fasi di passaggio da uno stato ad un altro. Pertanto, la diagnosi di una lesione avvenuta in vita, in *limine vitae* o *post-mortem*, richiede indagini accurate di laboratorio che permettano esprimersi con certezza in merito alla sussistenza o meno di reazioni vitali dei tessuti.

L'esame istologico ed immunoistochimico rappresentano le principali tecniche d'indagine per la diagnosi cronologica e di vitalità delle lesioni rispetto al decesso, poiché consentono di valutare le modificazioni cellulari e molecolari che caratterizzano le fasi infiammatoria, proliferativa e di riparazione proprie della risposta cutanea ad un insulto traumatico.

Per quanto concerne la valutazione medico-legale della vitalità delle lesioni cutanee, nei casi in cui il decesso si verifica nell'ordine di pochi minuti (5-10 minuti), le alterazioni microscopiche provocate in conseguenza dell'applicazione di una forza traumatica sui tegumenti, consistono nella presenza di fenomeni emorragici e nell'occasionale rilievo di leucociti isolati.

Inoltre, nel caso dell'impiccamento, la lesione cutanea del solco presenta altri segni istologici riferibili a reazioni con caratteristiche di vitalità, quali fenomeni di microembolizzazione lipidica ovvero la presenza di vescicole contenenti materiale eosinofilo e/o gocce lipidiche.

Le indagini immunoistochimiche sui preparati istologici di cute dei solchi hanno mostrato una significativa positività per l'espressione di marker quali triptasi, IL-15 e CD15.

La peculiarità della lesione cutanea del solco dell'impiccato è caratterizzata da un breve periodo di formazione rispetto al decesso (verosimilmente dell'ordine di meno di 3-4 minuti), quindi, il rilievo in tali lesioni della positività dei marker sopramenzionati (triptasi, IL-15, CD15), contribuisce ad fornire un elemento utile per il determinismo della vitalità di queste lesioni.

Per quanto concerne la diagnosi cronologica delle lesioni, oltre alle informazioni ottenute dall'istologia e dall'immunistochemica, che comunque non consentono di ottenere informazioni per lesioni prodottesi in meno di 4-5 minuti rispetto al decesso, se non per la positivizzazione della selectina P, l'applicazione di tecniche di *Real-Time* PCR consente la valutazione dell'espressione

dell'mRNA cellulare, che può venire rapportato alla produzione proteica della cellula in relazione all'insulto infiammatorio.

L'individuazione dell'mRNA riflette le "intenzioni" della cellula al momento della morte, definendo l'insieme delle proteine che la cellula stava per sintetizzare e in quali quantità, fornendo così ulteriori elementi utili sia per la valutazione della vitalità che per la diagnosi cronologica della lesione in esame.

L'obiettivo primario di tale protocollo sperimentale consiste in una valutazione preliminare, di tipo quali-quantitativo, del grado di espressione dei miRNA in campioni di lesioni cutanee del solco di soggetti impiccati, confrontandoli con campioni di cute sana.

L'attenzione sarà focalizzata soprattutto sul grado di iperespressione dei miRNA che la Letteratura riconosce come coinvolti nelle fasi precoci della risposta infiammatoria in seguito ad insulto cutaneo traumatico o infettivo, al fine di poter utilizzare tali molecole come futuro elemento probatorio utile per la valutazione medico-legale della diagnosi cronologica e di vitalità delle lesioni.

Inoltre, sulla base dei risultati ottenuti, si valuteranno:

- eventuali variazioni nell'espressione dei miRNA della cute del solco in merito alle modalità di conservazione dei campioni (in congelatore o in paraffina)⁵⁹;
- confronto tra i dati ottenuti attraverso l'indagine immunohistochimica e l'espressione dei miRNA nelle lesioni; eventuali variazioni dell'espressione dei miRNA in rapporto ad altre variabili come l'etnia dei soggetti ad esempio.

3.2 Materiali e metodi

Sono stati prelevati campioni di cute del solco in soggetti la cui causa di morte è stata riconosciuta quale asfissia meccanica acuta da impiccamento, con indagine necrosettoria eseguita entro 48 ore dalla constatazione di decesso.

La scelta di prelevare tale lesione risiede nella necessità di uniformare la valutazione per lesioni prodottesi attraverso lo stesso meccanismo di formazione ed in tempi analoghi rispetto al decesso.

I campioni di cute del solco sono stati prelevati in corrispondenza della regione del pieno

⁵⁹ In Letteratura vi sono opinioni contrastanti in merito alla possibile degradazione della molecola di RNA in rapporto alle modalità di conservazione dei campioni biologici. Infatti, la conservazione in formaldeide al 10% e successivamente l'inclusione in paraffina del campione, potrebbero danneggiare gli acidi nucleici e quindi compromettere l'espressione dei miRNA, generando risultati che dovrebbero considerarsi falsi positivi nella *down-regulation* di tali molecole. Tuttavia, si precisa che alcuni studi (di cui uno effettuato proprio su campioni di cute), hanno evidenziato l'assenza di differenze nell'espressione dei miRNA tra campioni biologici conservati in congelatore e campioni conservati in formalina al 10%/paraffina.

dell'ansa, ossia la regione anatomica in cui il laccio ha esercitato maggiore azione compressiva.

I campioni di lesione della cute del solco sono 39, di cui 13 conservati in congelatore alla temperatura di -20°C, mentre 26 conservati in formalina/paraffina.

Vista la Letteratura contrastante relativamente alle modalità di conservazione più idonee per effettuare indagini di biologia molecolare volte alla ricerca dei miRNA nei campioni di tessuto, questi sono stati conservati in formaldeide al 10% per un massimo di 48 ore e poi inclusi in paraffina.

I campioni di cute sana di controllo sono stati prelevati in parte da 9 dei soggetti deceduti per asfissia meccanica acuta estrinsecata secondo i meccanismi dell'impiccamento ed appartengono agli stessi individui per cui è stata prelevata la cute del solco, mentre 6 campioni di cute sana sono stati prelevati da regioni del collo di soggetti deceduti per cause naturali, non violente. In tutti i casi il prelievo è stato eseguito in corrispondenza della regione anteriore del collo. Inoltre, i campioni di cute di controllo non presentavano lesioni traumatiche ovvero lesioni macroscopiche riferibili a patologie cutanee, così come la documentazione sanitaria a disposizione risultava negativa per la presenza di patologie sistemiche ad interessamento cutaneo quali psoriasi, sclerodermia, dermatomiosite ovvero neoplasie.

Tutti i campioni sono stati prelevati da soggetti di sesso maschile, di età compresa tra 40 e 60 anni.

Per quanto concerne i frammenti di cute conservati in congelatore, l'estrazione dei miRNA è stata effettuata a distanza di 48 ore seguendo la procedura che segue:

- dopo lo scongelamento dei campioni e prima di eseguire la distruzione e l'omogenizzazione del materiale, si è provveduto ad aggiungere il reagente stabilizzante *RNA later* RNA Stabilization Reagent®, poiché la molecola di RNA tende a degradarsi con l'incremento della temperatura;

- il campione è stato degradato per consentire la liberazione delle molecole di RNA attraverso la distruzione delle membrane plasmatiche e degli organuli cellulari. La lisi del materiale è stata eseguita servendosi di QIAzol Lysis Reagent® (700 µl);

- si è provveduto all'omogenizzazione del materiale per ridurre la viscosità dei prodotti lisati;

- il materiale omogenato è stato conservato per 5 minuti a temperatura ambiente (compresa tra 15 e 25°C);

- alla soluzione sono stati aggiunti 140 µl di triclorometano (cloroformio) ed il contenitore è stato agitato per 15 secondi;

- il materiale è stato lasciato per 2-3 minuti a temperatura ambiente (15-25°C) e

successivamente centrifugato per 15 minuti alla temperatura di 4°C. Dopo la procedura di centrifugazione, la soluzione del volume di circa 350 µl presentava tre fasi: la superiore, trasparente, acquosa, contenente RNA; l'intermedia biancastra; la sottostante, rossastra, contenente residui organici;

Dopo questa prima fase di purificazione ed estrazione della molecola di RNA, si è passati alla separazione dei microRNA dalle molecole di RNA contenenti più di 200 nucleotidi, procedendo secondo i seguenti passaggi:

- la fase superiore della soluzione ottenuta precedentemente è stata trasferita in un nuova provetta. A questa venivano aggiunti 350 µl di soluzione al 70% di etanolo e successivamente la soluzione veniva agitata attraverso l'ausilio del vortex;

- la soluzione ottenuta e di circa 700 µl, con tutti i precipitati formati, è stata inserita in una '*spin column*' di RNeasy Mini a sua volta inserita in una '*collection tube*' da 2 ml. Questa è stata centrifugata per 15 secondi a temperatura ambiente (15- 25°C), e, attraverso l'utilizzo di una pipetta, il filtrato (contenente miRNA) è stato trasferito in una '*reaction tube*' da 2 ml; al filtrato sono stati aggiunti 450 µl di soluzione al 100% di etanolo e la soluzione è stata sottoposta ad agitazione con vortex;

- sono stati così prelevati 700 µl dalla soluzione ottenuta ed inseriti in una provetta '*spin column*' di RNeasy MinElute. Questa, a sua volta, è stata inserita in una provetta '*collection tube*' da 2 ml. Si è proceduto a centrifugazione per 15 secondi a temperatura ambiente (15-25°C) ed all'eliminazione del filtrato;

- sono stati aggiunti alla soluzione 700 µl di Buffer RWT, è stata eseguita una centrifugazione successiva per 15 secondi a temperatura ambiente (15-25°C) con eliminazione del filtrato;

- sono stati aggiunti altri 500 µl di Buffer RWT alla soluzione presente nella '*spin column*' RNeasy MinElute; essa è stata centrifugata per 15 secondi a temperatura ambiente (15-25°C) ed il filtrato è stato eliminato;

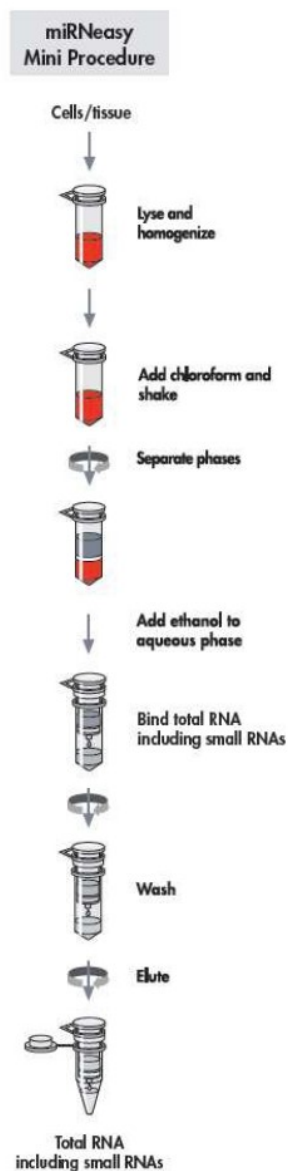
- sono stati aggiunti alla soluzione 500 µl di etanolo all'80% nella '*spin column*' RNeasy MinElute. Si è proceduto a centrifugazione per 2 minuti a temperatura ambiente (15-25°C) ed all'eliminazione del filtrato e della '*collection tube*' da 2 ml;

- la '*spin column*' RNeasy MinElute è stata inserita in una nuova '*collection tube*' da 2 ml e centrifugata per 5 minuti.

- la '*spin column*' RNeasy MinElute è stata inserita in una nuova provetta da 15 ml, a cui sono stati aggiunti 14 microL di soluzine '*RNasi-free water*' in corrispondenza del filtro della '*spin column*'. Successivamente la soluzione è stata centrifugata per 1 minuto per ottenere la

frazione di miRNA.

La procedura descritta viene schematizzata nella figura che segue, tratta dal manuale d'uso del kit utilizzato (Qiagen®).



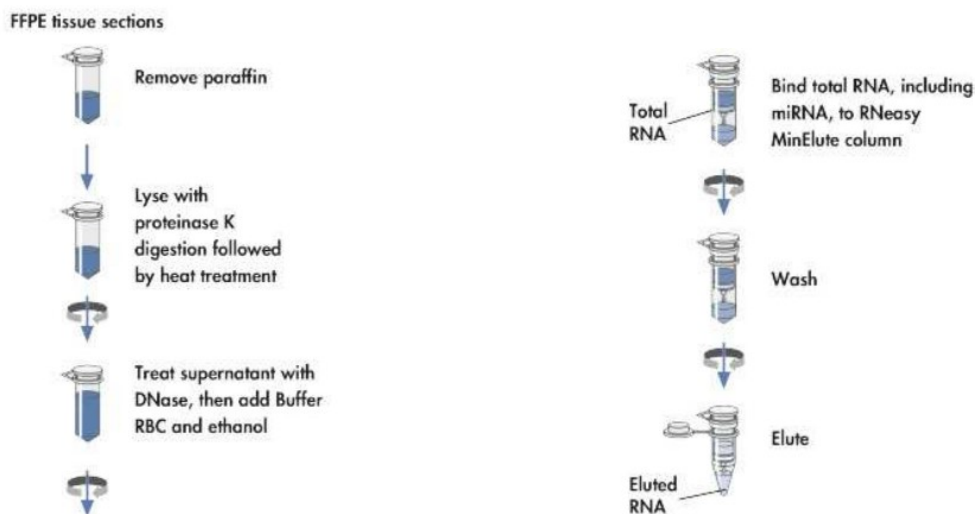
Per quanto concerne i frammenti di cute conservati in paraffina, l'estrazione dei miRNA è stata effettuata a distanza di 48 ore seguendo la procedura che segue:

- al campione incluso è stato rimosso l'eccesso di paraffina;
- il tessuto ottenuto è stato suddiviso in sezione di spessore compreso tra 5 e 20 μm ;
- il materiale, inserito in una 'collection tube', è stato deparaffinato e centrifugato per ottenere il campione da analizzare sul fondo del tubetto di raccolta;

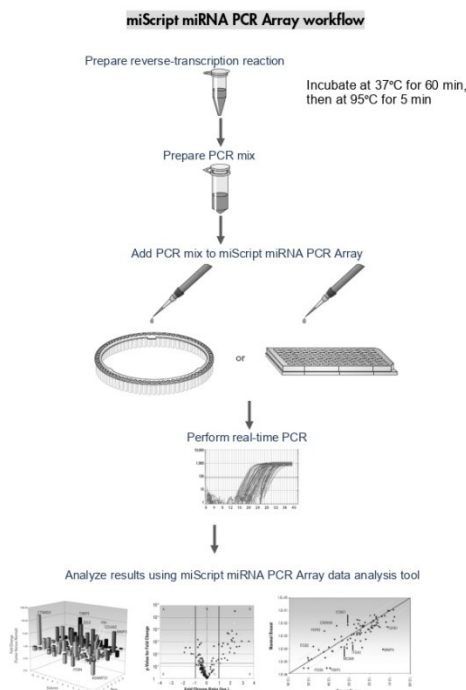
- la soluzione è stata posta a temperatura di 56°C per 3 minuti e poi lasciata raffreddare a temperatura ambiente (15-25°C);
- sono stati aggiunti 240 µl di Buffer PKD e la soluzione è stata agitata con il vortex;
- la soluzione è stata sottoposta a centrifugazione per un minuto e successivamente sono stati aggiunti 10 µl di proteinasi K. La soluzione è stata così sottoposta ad incubazione dapprima a 56°C per 15 minuti, poi a 80°C per altri 15 minuti;
- la fase trasparente della soluzione ottenuta è stata trasferita in una '*collection tube*' da 2 ml, essa è stata posta in ambiente con ghiaccio per 3 minuti e successivamente centrifugata per 15 minuti;
- il surnatante è stato trasferito in un'altra '*collection tube*' da 2 ml;
- sono state aggiunte DNasi Booster Buffer e DNasi I, la soluzione è stata centrifugata nuovamente e lasciata a temperatura ambiente per altri 15 minuti;
- sono stati aggiunti 500 µl di Buffer RBC e successivamente 1750 µl di etanolo (100%) e la soluzione ottenuta è stata miscelata attraverso l'ausilio della pipetta;
- della soluzione ottenuta sono stati prelevati 700 µl, inclusi i precipitati formati, ed il materiale prelevato è stato inserito in una RNeasy '*spin column*' a sua volta riposta in una '*collection tube*' da 2 ml. Si è provveduto a centrifugazione ed eliminazione del filtrato;
- sono stati aggiunti 500 µl di Buffer RPE nella RNeasy MinElute '*spin column*', con successiva centrifugazione ed eliminazione del filtrato;
- la procedura è stata ripetuta aggiungendo altri 500 µl di Buffer RPE nella RNeasy MinElute '*spin column*', provvedendo all'eliminazione, dopo centrifugazione, del filtrato e della '*collection tube*';
- l'RnEasy MinElute '*spin column*' è stata inserita in una '*collection tube*' da 2 ml e centrifugata per 5 minuti. Sono stati eliminati sia il filtrato che la '*collection tube*';
- l'RnEasy MinElute '*spin column*' è stata inserita in un'altra '*collection tube*' da 1.5 ml, sono stati aggiunti 14-30 µl di acqua '*RNasi free water*' direttamente sul filtro della '*spin column*'; si è provveduto a successiva centrifugazione per 1 minuto e raccolta della molecola di RNA.

La procedura descritta è schematizzata nella figura che segue, tratta dal manuale d'uso del kit utilizzato (Qiagen®).

miRNeasy FFPE Procedure



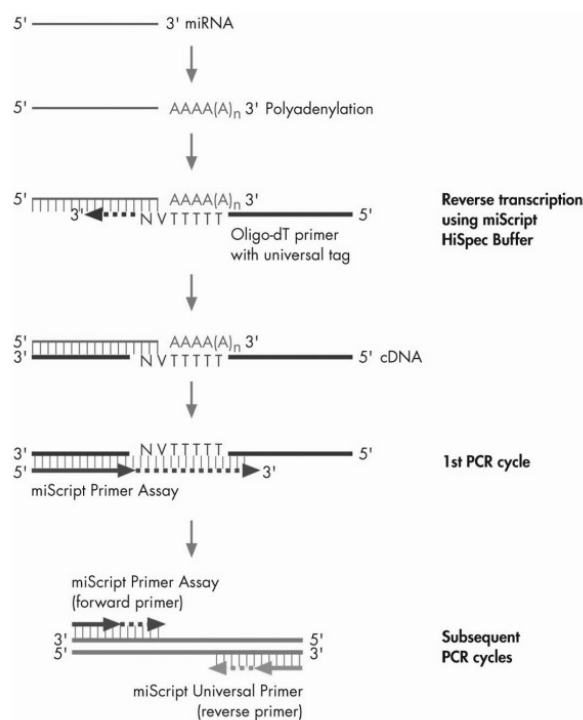
Dopo aver effettuato le procedure di laboratorio volte all'estrazione dei miRNA dai frammenti di cute conservati a fresco ed in paraffina, attraverso l'utilizzo di miScript® miRNA PCR Array, si è passati alla procedura di laboratorio volta alla quantizzazione dei singoli frammenti miRNA, secondo la flowchart di seguito allegata e tratta dal manuale d'uso del kit utilizzato (Qiagen®).



Inizialmente sono state eseguite le operazioni volte all'ottenimento di frammenti di DNA codificante (cDNA) a partire dai filamenti di microRNA. Infatti, l'utilizzo di miScript HiSpec

Buffer consente la trascrizione inversa dei filamenti di miRNA poliadenilati, in filamenti di DNA codificante (cDNA).

Il filamento di cDNA funge da *'template'* per l'esecuzione di indagini di *Real Time* PCR attraverso l'utilizzo di miScript miRNA PCR Array a 96 pozzetti. Ciascun pozzetto contiene i *primer* necessari per l'avvio della trascrizione dei filamenti di miRNA a partire dal cDNA.



La trascrizione inversa deve essere eseguita in ambiente con ghiaccio e prevede la creazione di una soluzione costituita da: 4µl di 5x miScript HiSpec Buffer, 2µl di 10x miScript Nucleis Mix, una quantità variabile di *'RNase-free water'*, 2µl di miScript Reverse Transcriptase Mix ed il Template RNA, per un volume totale di circa 20 µl.

La soluzione ottenuta è stata sottoposta ad incubazione a 37°C per 60 minuti e, successivamente, a 95°C per 15 minuti e depositata in ambiente con ghiaccio.

IL cDNA ottenuto è stato diluito in 180/200µl di *'RNase-free water'* e si è proceduto immediatamente all'esecuzione della Real Time PCR (tale procedura è stata eseguita appena prima del caricamento della piastra al fine di garantire la conservazione del filamento di cDNA).

Si è provveduto quindi alla preparazione del PCR mix, soluzione costituita da: 1375µl di 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 275µl di 10x miScript Universal Primer, 1000µl di Rnase-free water e 100µl di Template cDNA, per un volume totale di 2750µl, che è stata aggiunta ai pozzetti della piastra contenenti miScript miRNA PCR Array.

Quindi si è proceduto all'amplificazione dei miRNA attraverso l'utilizzo della strumentazione che ha consentito l'esecuzione della *Real Time* PCR (ABI PRISM 7300 RT-PCR platform), processo caratterizzato da una iniziale attivazione della PCR per 15 minuti a 95°C al fine di garantire l'attivazione della DNA polimerasi.

Successivamente sono stati eseguiti ciclicamente (per 40 volte) i seguenti passaggi, che caratterizzano la reazione a catena della polimerasi:

- fase di denaturazione con rottura dei legami idrogeno tra miRNA e cDNA, eseguita per 15 secondi a 94°C;
- fase *annealing* dei primer, eseguita per 30 secondi a 55°C;
- fase di estensione per trascrizione del filamento complementare, eseguita per 40 secondi a 70°C.

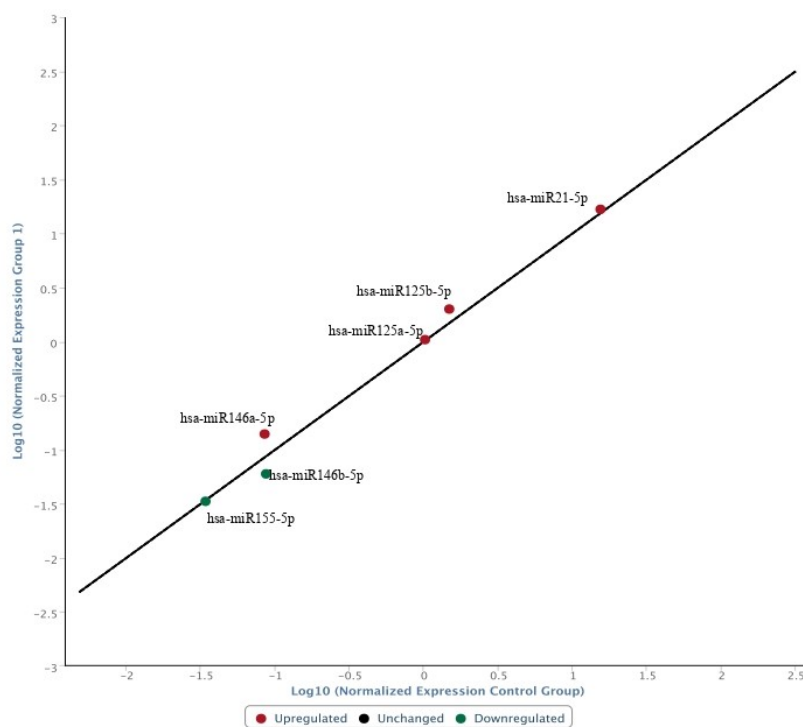
I risultati ottenuti sono stati quindi elaborati con il software di proprietà della QIAGEN® che permette l'ottenimento di grafici relativi all'entità dell'espressione dei miRNA, consentendo il confronto tra diversi gruppi di campioni.

La quantificazione dei miRNA viene misurata dal software a partire dal valore numerico definito come C_T ottenuto attraverso l'utilizzo della RT-PCR. Tali dati vengono elaborati attraverso l'utilizzo di un algoritmo ed i risultati ottenuti, espressi in $2^{-\Delta C_T}$ (variazione di secondo ordine dei valori numerici espressi in C_T), sono stati utilizzati per il confronto dei miRNA dei campioni della cute del solco con quelli della cute sana.

3.3 Risultati

L'espressione dei microRNA nei campioni sottoposti ad analisi è proposta attraverso grafici che consentono di evidenziare quali sono i miRNA iperespressi (*upregulated*) e quali ipoespressi (*downregulated*), rispetto ai valori medi che fanno riferimento ai campioni di cute sana di controllo.

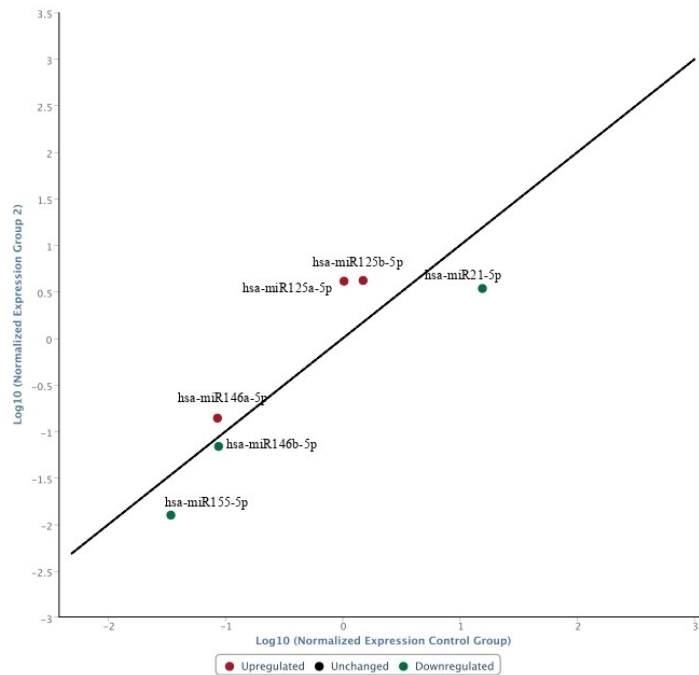
Il grafico seguente è relativo al confronto tra i valori dei microRNA espressi nei campioni di cute dei solchi conservati in congelatore rispetto ai campioni di cute di controllo.



Il grafico è caratterizzato dalla presenza di una linea retta nera che corrisponde alla media dei valori dei miRNA ottenuti dal gruppo di controllo costituito dai campioni di cute sana, dapprima normalizzati e poi espressi in funzione logaritmica sull'asse delle ascisse, mentre i valori dei microRNA della cute del solco sono riportati sull'asse delle ordinate

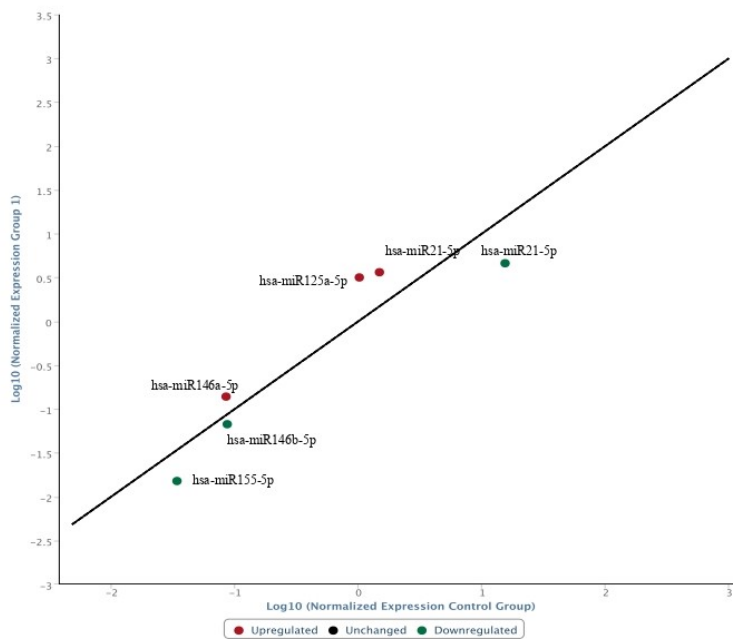
Relativamente ai microRNA che regolano la fase infiammatoria a carico della cute, i campioni del solco conservati in congelatore mostrano una iperespressione di: miR146a-5p, miR125a-5p, miR125b-5p, miR21-5p (pallino rosso) ed una ipoespressione di miR146b-5p e miR155-5p (pallino verde).

Il grafico seguente mostra le modificazioni dell'espressione degli stessi microRNA in campioni di solco conservati in paraffina rispetto al gruppo di controllo di cute sana.



In questo caso si evidenzia una iperespressione di miR146a-5p, miR125a-5p, miR125b-5p (pallino rosso), ed una ipoespressione di miR155-5p, miR146b-5p e miR21-5p.

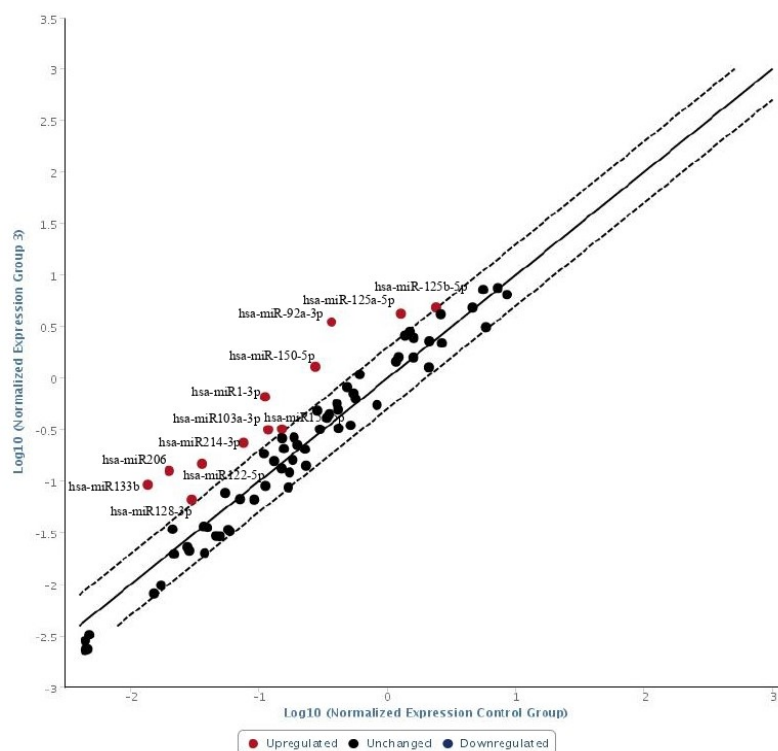
Infine, viene proposto un altro grafico che confronta l'espressione delle stesse molecole in tutti i campioni di solchi cutanei (conservati in congelatore ed in paraffina) rispetto alla cute sana.



In conclusione, per quanto riguarda le lesioni della cute del solco di soggetti impiccati, le indagini hanno evidenziato una iperespressione di miR-146a-5p, miR125a-5p, miR125b-5p ed una *downregulation* per miR155-5p, a miR146b-5p e miR21-5p.

Si precisa che, in considerazione delle differenti modalità di conservazione dei campioni della cute del solco (in parte conservati in congelatore, in parte in formalina e paraffina), non verranno proposte né ora né in seguito considerazioni in merito ai microRNA ipoespressi. Tale fenomeno, infatti, potrebbe ricondursi sia ad una reale *downregulation*, sia ad una ridotta quantificazione del miRNA a causa della degradazione della molecola di RNA ad opera dell'azione della formalina e della paraffina.

Estendendo l'analisi dei miRNA iperespressi a carico dei campioni di cute del solco, è stato possibile ottenere il seguente grafico.

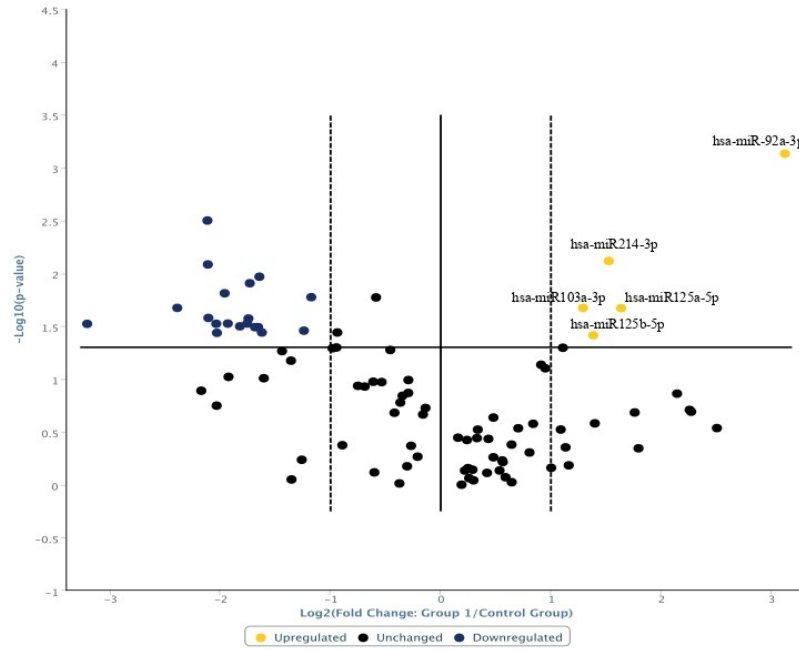


In questo caso, la valutazione del grado di espressione dei microRNA nella cute del solco ha previsto un confronto con i controlli considerati nella norma in un intervallo di valori compreso tra le due linee tratteggiate. Pertanto, questo ha consentito di porre in evidenza i miRNA che vengono maggiormente iperespressi nei campioni di cute del solco e che consistono in: miR128-5p, miR214-3p, miR133b, miR206, miR122-5p, miR103a-3p, miR15-5p, miR150-5p, miR92a-5p. A questi si aggiungono i miRNA per i quali è riconosciuto un ruolo di regolatori della risposta infiammatoria a livello cutaneo, ossia miR125a-5p e miR125b-5p.

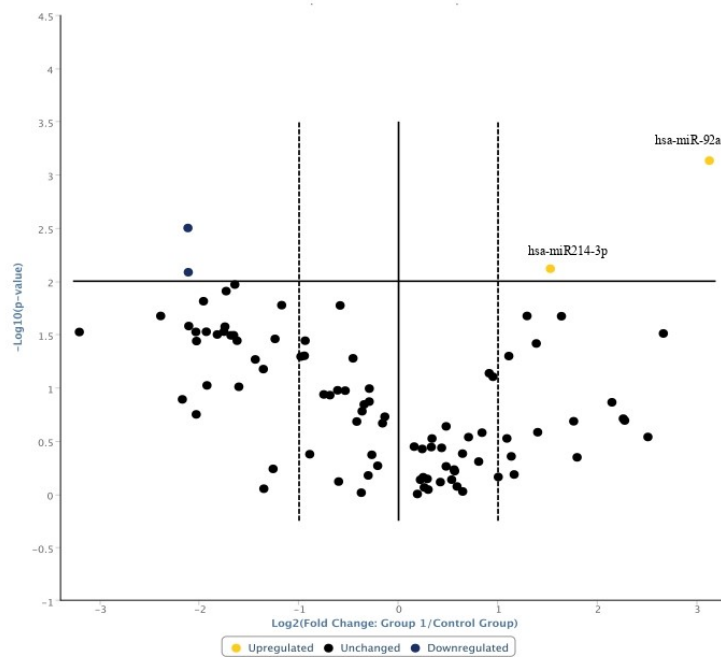
A partire dai dati ottenuti attraverso l'indagine descritta è stato possibile eseguire l'elaborazione statistica dei risultati ottenuti attraverso il test di Student, al fine di riconoscere l'eventuale esistenza di una significatività statistica dell'*upregulation* dei miRNA.

Il grafico seguente mostra i miRNA iperespressi in modo statisticamente significativo (p

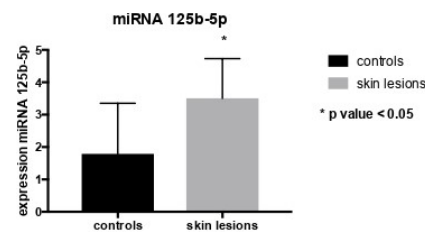
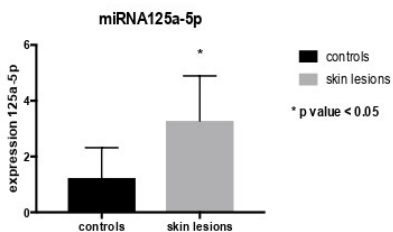
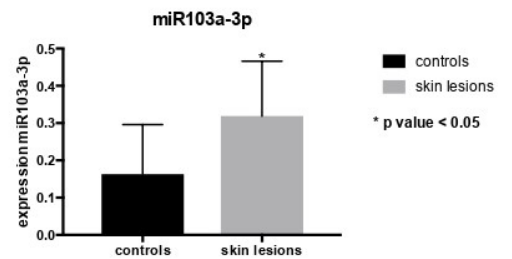
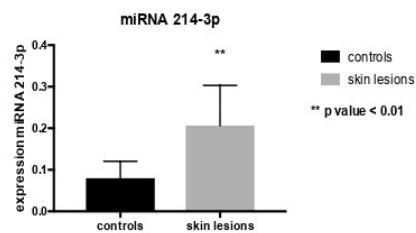
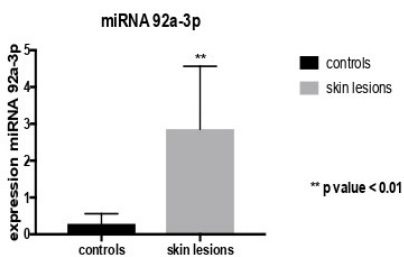
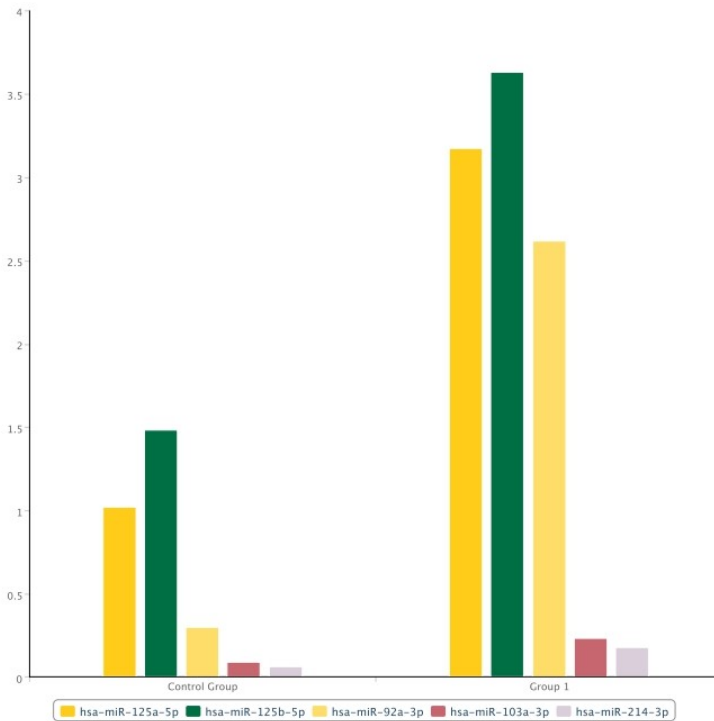
value < 0.05) rispetto alla quantificazione degli stessi nella cute di controllo, rappresentati nella parte alta e destra del grafico con i pallini di colore giallo: miR125a-5p, miR125b-5p e miR103a-3p.



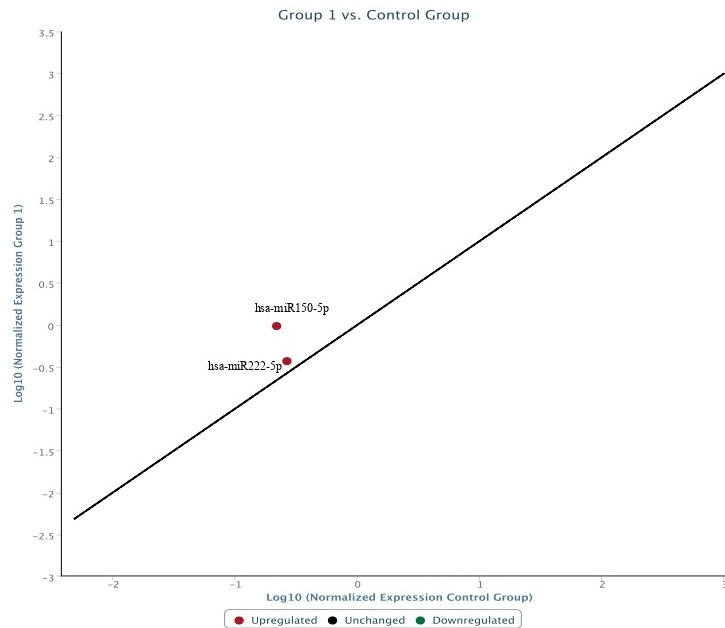
I miR214-3p e miR92a-3p sono iperespressi in modo statisticamente significativo con p value < 0.01.



I grafici che seguono mostrano l'incremento del valore dei miRNA iperespressi in modo statisticamente significativo nelle lesioni cutanee rispetto alla quantificazione degli stessi nella cute sana.



Per quanto concerne la correlazione tra i risultati dell'indagine immunohistochimica (positività per triptasi, IL15 e CD15) e i risultati ottenuti, sono stati indagati miR222-5p (molecola legata all'attivazione delle mast cellule), e miR150-5p (molecola che presenta alterazioni nei neutrofili dopo eventi traumatici dei tessuti).

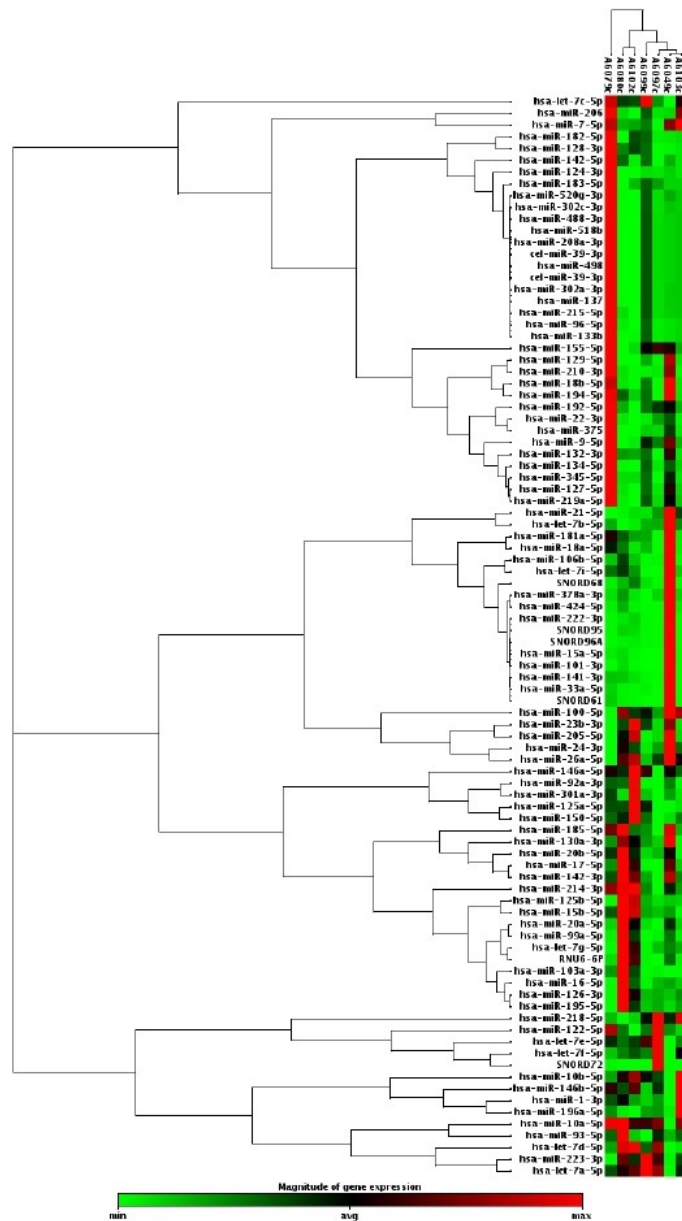


In entrambi i casi si apprezza una iperespressione di tali molecole, seppur in modo non statisticamente significativo. Non è stata effettuata nessuna correlazione tra espressione dei microRNA e IL15, poiché non sono stati trovati riferimenti bibliografici in cui viene associata l'espressione dei miRNA del kit utilizzato a tale citochina.

Ulteriore studio di approfondimento verrà eseguito cercando di analizzare l'espressione dei miRNA correlati all'IL15. Infine, si possono fornire le seguenti considerazioni che potrebbero risultare utili per l'estensione del campione da sottoporre ad analisi, sia per quanto concerne i campioni di cute lesionata, sia per quelli di cute sana.

Infatti, tra i campioni analizzati, un campione di cute sana utilizzato come controllo risultava appartenente a soggetto di origine africana rispetto agli altri caucasici.

Il grafico seguente mostra la variazione dell'espressione dei microRNA in tale campione rispetto agli altri campioni di controllo.



La prima riga corrisponde a quella del campione di cute appartenente al soggetto di colore, di origine asiatica, pakistana (etnie varie) ed evidenzia come qualitativamente ci sia una differente espressione dei microRNA rispetto agli altri campioni di soggetti caucasici.

3.4 Discussione

Il protocollo sperimentale eseguito ha consentito una valutazione preliminare di natura prevalentemente qualitativa, in merito all'espressione dei microRNA della cute, confrontando campioni di cute del solco di soggetti impiccati con campioni di cute sana.

I risultati sono stati interpretati in merito all'iperpressione di determinati microRNA nei campioni di lesione cutanea rispetto alla cute sana di controllo. Si ricorda che, nonostante si siano presentati fenomeni di ipoespressione per determinati miRNA nelle lesioni cutanee, in considerazione della possibile azione di degradazione della molecola di RNA nei campioni fissati in formalina/paraffina, si è preferito non considerare tali modificazioni dell'espressione dei miRNA, poiché non si può avere la certezza che si tratti di una *downregulation* effettiva ovvero di una ridotta quantificazione dei microRNA quale evento conseguente a degradazione degli stessi.

Per quanto concerne l'*upregulation* dei miRNA legati alla risposta infiammatoria nelle lesioni cutanee, ossia miR-146a-5p, miR146b-5p, miR125a-5p, miR125b-5p, miR155-5p e miR21-5p, si è riscontrata, nelle lesioni del solco, una iperespressione di miR146a-5p, miR125a-5p, miR125b-5p, che riproposta in valori numerici di $2^{-\Delta C_T}$ (variazione di secondo ordine dei valori espressi in C_T ottenuti dall'analisi del campione attraverso la RT-PCR), consente di evidenziare un incremento di miR125a-5p e miR125b-5p in modo statisticamente significativo (p value < 0.05).

miRNA	$2^{-\Delta C_T}$		p-value
	cute solco	cute sana	
hsa-miR146a-5p	0,138425	0,085014	0,29
hsa-miR125a-5p	3,169047	1,018685	0,021
hsa-miR125b-5p	3,629256	1,482607	0,021

Relativamente agli altri miRNA che risultano iperespressi nella cute del solco, è possibile fornire le seguenti spiegazioni in merito al loro riscontro, rifacendosi alle informazioni presenti in Letteratura circa la loro funzione e presenza nei tessuti.

I miR133b, miR206 e miR1-3p sono microRNA riscontrati prevalentemente a carico del tessuto muscolare scheletrico, poiché sono legati all'espressione di citochine infiammatorie prodotte in condizioni di miopatie infiammatorie degenerative⁶⁰.

⁶⁰ Georgantas R., Streicher K. Inhibition of Myogenic MicroRNAs 1, 133, 206, by Inflammatory Cytokines Links Inflammation and Muscle Degeneration In Adult Inflammatory Myopathies. *Arthritis and Reumatology* vol 66, 4, 2014.

Pertanto, l'iperespressione di tali molecole potrebbe essere legata a fenomeni precoci della risposta infiammatoria, tuttavia, poiché la loro espressione è strettamente legata alla produzione di TNF α (che come risulta dalle indagini immunohistochimiche non si positivizza in tali lesioni), e della loro elevata espressione nel tessuto muscolare scheletrico e cardiaco, è possibile che tali miRNA siano upregolati rispetto alla cute di controllo a causa del prelievo di tessuto muscolare scheletrico dalla parete anteriore del collo.

I miR128-3p, miR214-3p e miR130a-3p non sono stati ancora studiati a livello cutaneo, tuttavia possiedono azione antiinfiammatoria, poiché agiscono entrambi andando ad inibire le vie di trasduzione del segnale mediate dal fattore di trascrizione NF κ B^{61,62}, così come miR122-5p causa una ridotta produzione di citochine infiammatorie ed inibisce la traslocazione nucleare di NF κ B⁶³.

MiR92a-3p è coinvolto nella regolazione intracellulare dei segnali attivati dai Toll like receptor (TLR), pertanto potrebbe avere un ruolo regolatore della risposta infiammatoria⁶⁴.

L'analisi statistica di questi risultati effettuata attraverso il test di Student ha consentito di evidenziare, per i miRNA iperespressi, un incremento statisticamente significativo (con p value < 0.05) per miR103a-3p ed un incremento significativo (con p value < 0.01) per miR214-3p e miR92a-3p.

miRNA	2 ^{-ΔC_T}		p-value
	cute solco	cute sana	
hsa-miR92a-3p	2,615658	0,299873	0,000737
hsa-miR214a-3p	0,17712	0,061499	0,0076
hsa-miR103a-3p	0,11487	0,316256	0,038426

Pertanto, relativamente alla *upregulation* dei miRNA coinvolti in vari passaggi della risposta infiammatoria e riscontrati nei campioni di cute del solco, solamente i miR125a-5p e miR125b-5p sono ad oggi riconosciuti come molecole regolatrici della risposta infiammatoria a livello cutaneo.

⁶¹ Chu Q., Sun Y., Xu T. Inducible microRNA-214 contributes to the suppression of NF- κ B mediated inflammatory response via targeting MyD88 in fish. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, JBC in Press, 2017.

⁶² Xiaokelaiti H., Zhi X., Yusufjiang Y., Aikebaler A. MiR-128-3p regulates inflammatory response in LPS stimulated macrophages through the TLR-NF- κ B pathway. Int J Clin Exp Med 9, 8005-8013, 2016.

⁶³ Nakamura M., Kanda T., Sasaki R., Haga Y., Jiang X., Wu S., Nakamoto S., Yokosuka O. MicroRNA-122 inhibits the Production of Inflammatory Cytokines by Targeting the PKR Activator PACT in Human Hepatic Stellate Cells. PlosOne, 2015.

⁶⁴ Lai L., Song Y., Liu Y., Chen Q., Han Q., Chen W., Pan T., Zhang Y., Cao X., Wang Q. MicroRNA-92a Negatively Regulates Toll-like Receptor (TLR)-triggered Inflammatory Response in Macrophages by Targeting MKK4 Kinase. The Journal of Biological Chemistry 288, 7956–7967, 2013.

Tuttavia, anche miR214a-3p, miR128-3p, miR130a-3p e miR122-5p sono molecole che intervengono nella regolazione delle fasi della risposta infiammatoria, soprattutto con azione inibitoria delle vie di trasduzione del segnale che hanno funzione pro-infiammatoria e sono mediate dal fattore di trascrizione NFκB.

Allo stesso modo agisce come molecola regolatrice il miR92a-3p che, iperespresso, ha azione inibitoria verso le vie di trasduzione del segnale mediate dai TLR.

La differenza di espressione dei miRNA delle lesioni cutanee su base infiammatoria (come psoriasi, sclerodermia e dermatomiosite), e che hanno consentito di definire come principali regolatori in senso antiinfiammatorio miR146, miR155 e miR21, e le lesioni della cute del solco, potrebbero ipoteticamente ricondursi ai tempi differenti con cui si formano queste lesioni. Infatti, le lesioni cutanee vengono studiate una volta che si sono manifestate clinicamente, per cui i processi molecolari e cellulari della fase infiammatoria hanno avuto più tempo per manifestarsi, rispetto a quanto si verifica nella cute del solco caratterizzata da fenomeni molecolari e cellulari che si instaurano in pochi minuti.

Infine, si sottolinea la differenza di espressione dei miRNA nella cute sana riscontrata nei soggetti di diversa etnia. Tale aspetto è importante poiché suggerisce la necessità una estensione del campione da sottoporre ad analisi, ma anche una standardizzazione dei controlli poiché una differente espressione dei miRNA a causa di differenze etniche potrebbe influenzare i risultati, anche solo per i campioni da utilizzare come gruppo controllo.

3.5 Considerazioni conclusive

Il protocollo sperimentale ha consentito di evidenziare una differente espressione di microRNA in lesioni cutanee del collo di soggetti impiccati rispetto alla cute sana priva di lesioni macroscopiche.

Le indagini hanno consentito di evidenziare un incremento dell'espressione di miRNA riconosciuti come regolatori della risposta infiammatoria in lesioni cutanee come miR125a-5p e miR125b-5p. Inoltre, si è verificata una iperespressione di altri miRNA che agiscono con attività antiinfiammatoria a livello dei segnali intracellulari come miR214a-3p, miR128-3p, miR130a-3p, miR122-5 e miR92a-3p che, per miR214a-3p, miR130a-3p e miR92a-3p, risulta statisticamente significativa rispetto alla cute sana.

Questo dato conferma come l'espressione dei miRNA in caso di insulto traumatico cutaneo sia riferibile ad un'azione di regolazione della fase infiammatoria, volta ad inibire i segnali intracellulari attivati dalla produzione di citochine infiammatorie, anche in caso di lesioni che si sviluppano in tempi molto brevi, dell'ordine di pochi minuti. Questo aspetto differenzia tale

indagine rispetto a quelle condotte su lesioni cutanee prodotte da patologie come psoriasi, sclerodermia e dermatomiosite, poiché queste determinano una risposta infiammatoria che si sviluppa nel tempo e consente il succedersi di fenomeni cellulari e molecolari che non hanno il tempo di comparire nelle lesioni cutanee del collo in seguito ad impiccamento. Tale elemento potrebbe essere rilevante nel determinare la differente espressione dei microRNA riscontrata.

I microRNA iperespressi nel corso di tale indagine dovranno essere studiati con maggiore attenzione poiché coinvolti nella risposta infiammatoria e, quindi, possibili molecole regolatrici di una precoce attivazione della risposta infiammatoria indotta dall'insulto traumatico, come nel caso delle lesioni in esame. Inoltre, l'*upregulation* di miR222-3p e miR150-5p, rispettivamente legati all'attivazione di mast cellule e dei neutrofili dopo l'applicazione di stimoli esogeni, anche di natura traumatica, sostiene il dato ottenuto all'indagine immunoistochimica.

La conferma dei risultati ottenuti richiede, tuttavia, una adeguata estensione del campione da sottoporre ad analisi, affinché sia consentita una più corretta elaborazione statistica dei risultati, focalizzando l'attenzione sia sui risultati ottenuti nel corso di tale indagine, sia sulla possibile differenza di espressione dei miRNA anche rapporto all'etnia dei soggetti.

Concludendo, questa valutazione preliminare ha fornito gli elementi per riconoscere una iperespressione di miRNA legati alla risposta infiammatoria nel caso di lesioni cutanee prodotte a carico della cute del collo in corso di impiccamento, rispetto a quanto si rileva per i campioni di cute sana. Tali dati, se dovessero trovare conferma dopo una adeguata estensione del campione da sottoporre ad analisi, potrebbero risultare un elemento medico-legale utile per la diagnosi di vitalità delle lesioni. Inoltre, confrontando la differenza di espressione dei miRNA nelle lesioni esaminate con quelli espressi in lesioni cutanee originatesi in tempi diversi, tali molecole potrebbero divenire utili per la diagnosi cronologica delle lesioni, integrando il dato relativo all'espressione dei miRNA con quanto evidenziato dalle indagini istologiche ed immunoistochimiche.

4. Bibliografia

1. Cecchi R. Estimating wound age: looking into the future. *Int J legal Med* 124: 523-536, 2010.
2. He L., Zhu J. Distinguishing antemortem from postmortem injuries by LTB4 quantification. *Forensic Sci Int* 81:11–16, 1996.
3. Ono E., Taniguchi M., Mita H., Fukutomi Y., Higashi N., Miyazaki E., Kumamoto T., Akiyama K. Increased
4. production of cysteinyl leukotrienes and prostaglandin D2 during human anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 39:72– 80, 2008.
5. Hernández-Cueto C., Vieira D.N., Girela E., Marques E., Calvo M.D., Villalobos M., Oliveira de Sà F., Villanueva E. Prostaglandin F2a (PGF2a): an inadequate marker of the vitality of wounds? *Int J Leg Med* 106:312–314, 1994.
6. Grellner W., Georg T., Wilske J. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds. *Forensic Sci Int* 113:251–264, 2000.
7. Sato Y., Ohshima T. The expression of mRNA of proinflammatory cytokines during skin wound healing in mice:a preliminary study for forensic wound age estimation (II). *Int J Legal Med* 113:140–145, 2000.
8. Grellner W. Time-dependent immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds. *Forensic Sci Int* 130:90–96, 2000.
9. Bacci S., Romagnoli P., Norelli G.A., Forestieri A.L., Bonelli A. Early increase in TNF-alpha-containing mast cells in skin lesions. *Int J Legal Med* 120:138–142, 2006.
10. Grellner W., Vieler S., Madea B. Transforming growth factors (TGF-alpha and TGF-beta1) in the determination of vitality and wound age: immunohistochemical study on human skin wounds. *Forensic Sci Int* 153:174–180, 2005.
11. Kondo T. Timing of skin wounds. *Leg Med (Tokyo)* 9:109–114, 2007.
12. Van der Laan N., de Leij L.F.M.H., Ten Duis H.J. Immuno-histopathological appearance of three different types of injury in human skin. *Inflamm Res* 50:350–356, 2001.
13. Jiao A., Fish S.C., Mason L.E., Shelling S.H., Goldman S.J., Williams C.M. A role for endothelial selectins and nonallergic inflammatory disease. *Ann Allergy Asthma Immunol* 98:83–88, 2007.
14. Dressler J., Bachmann L., Koch R., Müller E. Enhanced expression of selectins in human skin wounds. *Int J Legal Med* 112:39–44, 1999.
15. Dressler J., Bachmann L., Kasper M., Hauck J.G., Müller E. Time dependence of the expression of ICAM-1 (CD 54) in human skin wounds. *Int J Legal Med* 110:299–304,

1997.

16. Dressler J., Bachmann L., Koch R., Müller E. Estimation of wound age and VCAM-1 in human skin. *Int J Legal Med* 112:159–162, 1999.

17. Kondo T., Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Science International* 203: 93-98, 2010.

18. Takamiya M., Saigusa K., Aoki Y. Immunohistochemical study of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression for age determination of cutaneous wounds. *Am J Forensic Med Pathol* 23:264–267, 2002.

19. Kondo T., Tanaka J., Ishida Y., Mori R., Takayasu T., Ohshima T. Ubiquitin expression in skin wounds and its application to forensic wound age determination. *Int J Legal Med* 116:267–272, 2002.

20. Ishida Y., Kimura A., Takayasu T., Eisenmenger W., Kondo T. Detection of fibrocytes in human skin wounds and its application for wound age determination. *Int J Legal Med* 123:299–304, 2009.

21. Antoniadou H.N., Galanopoulos T., Neville-Golden J., Kiritsy C.P., Lynch S.E. p53 expression during normal tissue regeneration in response to acute cutaneous injury in swine. *J Clin Invest* 93:2206–2214, 2004.

22. Hausmann R., Nerlich A., Betz P. The time-related expression of p53 protein in human skin wounds—a quantitative immunohistochemical analysis. *Int J Legal Med* 111:169–172, 1998.

23. Bonelli A., Bacci S., Norelli G.A. Affinity cytochemistry analysis of mast cells in skin lesions: a possible tool to assess the timing of lesions after death. *Int J Legal Med* 117:331–334, 2003.

24. Bonelli A., Bacci S., Vannelli B., Norelli G.A. Immunohistochemical localization of mast cells as a tool for the discrimination of vital and postmortem lesions. *Int J Legal Med* 117:14–18, 2003.

25. Turillazzi E., Vacchiano G., Lune-Maldonado A., Neri M., Pomara C., Rabozzi R., Riezzo I., Fineschi V., Tryptase, CD-15 and IL-15 as reliable markers for the determination of soft and hard ligature marks vitality, *Histol Histopathol*, 25: 1539-1546, 2010.

26. Sato Y., Ohshima T. The expression of mRNA of proinflammatory cytokines during skin wound healing in mice: a preliminary study for forensic wound age estimation. *Int J Legal Med* 133: 140-145, 2010.

27. Takamiya M., Fujita S., Saigusa K., Aoki Y. A study on mRNA expressions of interleukin 10 during fracture healing for wound age determination. *Leg Med* 10:131-137,

2008.

28. Bai R., Wan I., Shi M. The time dependent expression of IL-beta. COX 2, MCP-1 mRNA in skin wounds of rabbits. *Forensic Sci Int* 175: 193-197, 2008.
29. Kondo T. Timing of skin wounds. *Legal Medicine* 9:109-114, 2007.
30. Kondo T., Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Science International* 203: 93-98, 2010.
31. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843-854, 1993.
32. Ha M., Kim V.N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 509–524, 2014.
33. Macfarlane L.A., Murphy P.R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*. Nov;11(7):537-61, 2010.
34. Poos K., Smida J., Nathrath M., Maugg D., Baumhoer D., Korsching E. How MicroRNA and Transcription Factor Co-regulatory Networks Affect Osteosarcoma Cell Proliferation. *Plos Computational biology*.
35. Wojcicka A., Swierniak M., Kornasiewicz O., Gierlikowski W., Maciag M., Kolanowska M., Kotlarek M., Gornicka B., Koperski L., Niewinski G., Krawczyk M., Jazdzewski K. Next generation sequencing reveals microRNA isoforms in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* Volume 53, 208– 217, 2014.
36. Sharma N., Verma R., Kumawat K.L., Basu A., Singh S.K. miR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 strain infection in human microglial cells. *J Neuroinflammation* 12(1):249, 2015.
37. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297, 2004.
38. Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., Jaenisch, R., Sharp, P.A., and Jacks, T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*, 132: 875-886, 2008.
39. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., and Kim, V.N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J*, 21: 4663-4670, 2002.
40. Blahna M.T., Hata A. Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. *FEBS Letters* Volume 586, Issue 14, pagine 1906–1912, luglio 2014.

41. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297, 2004.
42. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V.M. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425: 415-9, 2003.
43. Yeom K.H., Lee Y., Han J., Suh M.R., Kim V.N. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res*, 34: 4622-9, 2006.
44. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297, 2004.
45. Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J., Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & development*, 20:515–524, 2006.
46. Mittelbrunn M., Gutiérrez-Vázquez C., Villarroya-Beltri C., González S., Sánchez-Cabo F., González MÁ., Bernad A., Sánchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen presenting cells. *Nat Commun*. 2:282, 2011.
47. Zhang Y., Liu D., Chen X., Li J., Li L., Bian Z., Sun F., Lu J., Yin Y., Cai X., Sun Q., Wang K., Ba Y., Wang Q., Wang D., Yang J., Liu P., Xu T., Yan Q., Zhang J., Zen K., Zhang C.Y. Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration, *Molecular Cell* 39, 133–144, 2010.
48. Yang C., Robbins P.D. The Roles of Tumor-Derived Exosomes in Cancer Pathogenesis, *Clinical and Developmental Immunology*, 2011.
49. Meder B., Backes C., Haas J., Leidinger P., Stahler C., Gossmann T., Vogel B., Frese K., Giannitis E., Katus H.A., Meese E., Heller A. Influence of the Confounding Factors Age and Sex on MicroRNA Profiles from Peripheral Blood. *Clinical Chemistry* 60:9, 1200-1204, 2014.
50. Nagy C., Maheu M., Lopez J.P., Vaillancourt K., Cruceanu C., Gross J.A., Arnovitz M., Mechawar N., Turecki G. Effects of post mortem interval on biomolecule integrity in the brain. *J. Neuropathol Exp. Neurol.* 74, 459-469, 2015.
51. Lv Y.H., Ma K.J., Zhang H., He M., Zhang P., Shen Y.W., Jiang N., Ma,D. and Chen,L. A time course study demonstrating mRNA, microRNA, 18S rRNA, and U6 snRNA changes to estimate PMI in deceased rat's spleen. *J. Forensic Sci.*, 59, 1286–1294, 2014.

52. Andl T., Murchison E.P., Liu F., Zhang Y., Yunta-Gonzalez M., Tobias J.W., Andl C.D., Seykora J.T., Hannon G.J., Millar S.E. The miRNA-processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles. *Curr Biol.* 16(10):1041–1049, 2006.
53. Yi R., Pasolli H.A., Landthaler M., Hafner M., Ojo T., Sheridan R., Sander C., O'Carroll D., Stoffel M., Tuschl T., Fuchs E. Dgcr8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(2):498–502, 2009.
54. Liu S., Tetzlaff M.T., Liu A., Liegl-Atzwanger B., Guo J. and Xu X. Loss of microRNA-205 expression is associated with melanoma progression. *Lab. Invest.*, 92, 1084–1096, 2012.
55. Banerjee J., Sen C.K. MicroRNA in Skin and Wound Healing. *Methods Mol Biol*, 936: 343-356, 2013.
56. Jinnin M. Recent progress in studies of miRNA and skin disease. *Journal of Dermatology*, 42, 551-558, 2015.
57. Roy S., Sen C.K. MiRNA in innate immune responses: novel players in wound inflammation. *Physiol. Genomics*, 43, 557-565, 2011.
58. Wang T., Feng Y., Sun H., Zhag L., Hao L., Shi C., Wang J., Li R., Ranx X., Su Y., Zou Z. miR-21 Regulates Skin Wound Healing by Targeting Multiple Aspects of the Healing Process. *The American Journal of Pathology*, 181:6, 2012.
59. Lee H.M., Kim T.S., Jo E.K. MiR-146 e mir-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Rep* 46(6), 311-318, 2016.



Università
degli Studi
di Ferrara

Sezioni

Dottorati di ricerca

Il tuo indirizzo e-mail

fbbmtt1@unife.it

Oggetto:

Dichiarazione di conformità della tesi di Dottorato

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)

Fabbrì Matteo

Nato a:

Bondeno

Provincia:

Ferrara

Il giorno:

21.10.1981

Avendo frequentato il Dottorato di Ricerca in:

Scienze Biomediche e Biotecnologiche

Ciclo di Dottorato

33

Titolo della tesi:

Lesioni di interesse medico-legale: espressione di marcatori miRNA nel solco cutaneo di soggetti impiccati

Titolo della tesi (traduzione):

Tutore: Prof. (Cognome e Nome)

Neri Margherita

Settore Scientifico Disciplinare (S.S.D.)

MED/43

Parole chiave della tesi (max 10):

espressione genica; miRNA; impiccamento; solco cutaneo

Consapevole, dichiara

CONSAPEVOLE: (1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; (2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; (3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 2 copie di cui una in formato cartaceo e una in formato pdf non modificabile su idonei supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito: <http://www.unife.it/studenti/dottorato> alla voce ESAME FINALE – disposizioni e modulistica; (4) del fatto che l'Università, sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze; DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITÀ: (1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo è del tutto identica

a quella presentata in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrò in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; (2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie; (3) che il contenuto e l'organizzazione della tesi è opera originale da me realizzata e non compromette in alcun modo i diritti di terzi, ivi compresi quelli relativi alla sicurezza dei dati personali; che pertanto l'Università è in ogni caso esente da responsabilità di qualsivoglia natura civile, amministrativa o penale e sarà da me tenuta indenne da qualsiasi richiesta o rivendicazione da parte di terzi; (4) che la tesi di dottorato non è il risultato di attività rientranti nella normativa sulla proprietà industriale, non è stata prodotta nell'ambito di progetti finanziati da soggetti pubblici o privati con vincoli alla divulgazione dei risultati, non è oggetto di eventuali registrazioni di tipo brevettuale o di tutela. PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO

Firma del dottorando

Ferrara, li 20 gennaio 2021 Firma del Dottorando

Firma del Tutore

Visto: Il Tutore Si approva Firma del Tutore



The image shows two handwritten signatures in black ink. The first signature is above the line for the doctorant's signature, and the second is above the line for the supervisor's signature. To the right of the supervisor's signature is a blue circular official stamp of the University of Ferrara. The stamp contains the text 'Medicina Legale e Assicurazioni' and 'Università di Ferrara' around a central emblem.