



**Università
degli Studi
di Ferrara**

Università 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

Dottorando
Dott. Matteo Fabbri

Tutor:
Prof. Margherita Neri

Anni 2017/2020

Pagina 1 di 4

Introduzione

La datazione cronologica di una ferita rappresenta una delle sfide più difficili ed affascinanti per il patologo forense. In modo particolare, proprio quando viene chiesto allo stesso di stabilire la vitalità di una lesione cutanea in quanto, proprio nelle prime fasi del processo di rigenerazione, gli esami istologici ed immunoistochimici tradizionali potrebbero non fornire solide prove oggettive. In conseguenza di ciò, negli anni, sono stati compiuti numerosi studi coinvolgenti le numerose molecole biologiche coinvolte nel processo di riparazione delle ferite, allo scopo di identificare biomarcatori sempre più affidabili e proprio nelle fasi precoci del processo di guarigione. Inoltre, i predetti studi hanno visto l'applicazione di tecniche avanzate, allo scopo di produrre dati accurati e robusti.

In relazione al fatto che i microRNA (miRNAs) svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione di proteine chiave coinvolte nella risposta infiammatoria, si è proceduto a verificare sperimentalmente se l'espressione di alcuni miRNA specifici risultasse essere modificata proprio analizzando da un punto di vista molecolare il solco (abrasione classica determinata dal materiale utilizzato per la produzione del cappio) prodotto nella morte per impiccagione.

Allo stesso tempo, è stato dimostrato come l'esame grossolano ed istologico di tali lesioni possa in alcune circostanze risultare inaffidabile ed indurre in errore il patologo forense a concludere sul fatto che possano essere determinati da sospensione o sospensione post mortem del corpo.

Obiettivi

L'obiettivo dello studio proposto è stato quello di studiare l'espressione di un pannello di miRNA in campioni di pelle derivati da casi autoptici di morte per impiccamento, allo scopo di comprendere e differenziare se tali lesioni si fossero verificate prima o successivamente rispetto alla morte del soggetto. Lo studio proposto è stato modulato in due fasi distinte.

Nella prima, sono stati analizzati campioni di cute prelevati durante l'esame autoptico e quindi immediatamente congelati. Nella seconda fase, si è proceduto a validare i risultati ottenuti da campioni di cute inclusi in paraffina, allo scopo di comprendere l'applicabilità dell'indagine molecolare anche a campioni autoptici che generalmente vengono conservati secondo tali modalità.

Allo scopo di prevenire possibili alterazioni molecolari di espressione determinate da patologie o malattie, sono stati scelti unicamente i soggetti che si trovavano in uno stato di salute apparentemente buono prima della morte. In fase di prelievo, tutti i campioni sono stati resi anonimi e quindi distrutti dopo il loro utilizzo.

Materiali e metodi

I campioni utilizzati nel presente studio (cute del solco e campioni di controllo) erano rappresentati da sezioni trasversali di 1.5-4.0 cm di tessuto, prelevate durante le procedure autoptiche. Sono stati prelevati un totale 39 campioni di cute del solco in soggetti la cui causa di morte è stata riconosciuta

quale asfissia meccanica acuta da impiccamento (13 conservati in congelatore, 26 fissati in formalina e inclusi in paraffina).

A questi 39 campioni si aggiungono 15 controlli di cute sana (9 prelevati dalla regione addominale di 9 dei soggetti deceduti per impiccamento, 6 dalla stessa regione di soggetti deceduti per altra causa).

L' estrazione dei miRNAs è stata condotta utilizzando i kit miRNeasy mini[®] e RNeasy FFPE[®] kit (Qiagen[®]). La fase di retrotrascrizione delle molecole di miRNA è stata operata utilizzando il kit miScript II RT (Qiagen[®]). I cDNAs risultanti hanno rappresentato il template della reazione di RT-PCR, operata mediante l'impiego del kit miScript[®] miRNA PCR Array - Human Cell differentiation & Development (Qiagen[®]).

La quantificazione è stata operata secondo il metodo del $\Delta\Delta C_t$, grazie alla presenza di controlli interni di reazione e normalizzazione, impiegando il software miScript miRNA PCR array web-based (Qiagen[®]) e seguendo quanto riportato all'interno del manuale d'uso del produttore.

Risultati

Lo studio ha mostrato un aumento statisticamente significativo, in termini di espressione genica, per i marcatori identificati nel miR-125a-5p e miR-125b-5p. Inoltre, è stata osservata un'iper-espressione per i marcatori miR-150-5p, miR-126-3p, miR-16-5p, miR-195-5p, miR-23-3p, miR-let7a-3p ($p < 0,01$) e miR-let7d-3p, miR-let7c-3p, miR-let7e-3p, miR-222-3p, miR-214-3p, miR-205-5p, miR-92a-3p, miR-103a-3p ($p < 0,05$).

Tra questi markers, miR-125a-5p e miR-125b-5p sembrano essere correlati alla risposta infiammatoria nel processo di riparazione delle lesioni cutanee. Inoltre, è stata evidenziata un'iper-espressione di ulteriori miRNA rappresentati da miR214a-3p, miR128-3p, miR130a-3p e miR92a-3p, per i quali viene riconosciuta un'attività antinfiammatoria. È stato possibile documentare una significatività statistica rispetto all'espressione genica rilevata dall'analisi dei campioni di cute di controllo solamente per miR103a-3p ($p < 0,05$), miR214-3p e miR92a-3p ($p < 0,01$). L'iper-espressione di miR222-3p e miR150-5p, rispettivamente connessi all'attivazione delle mast-cellule dei neutrofili a seguito dell'applicazione di uno stimolo di natura traumatica, supporta i dati immunoistochimici mostrati in letteratura.

Conclusioni

I risultati ottenuti hanno mostrato un aumento statisticamente significativo dell'espressione dei miRNA riconosciuti quali regolatori della risposta infiammatoria in lesioni cutanee e rappresentati da miR125a-5p e miR125b-5p. Inoltre, è stata evidenziata un'iper-espressione di ulteriori marcatori miRNA, rappresentati da miR214a-3p, miR128-3p, miR130a-3p, miR122-5p e miR92a-3p, anch'essi correlati all'attività anti-infiammatoria. Tuttavia, è stato possibile documentare una significatività

statisticamente significativa, rispetto ai campioni di pelle di controllo, unicamente nei confronti di miR214a-3p, miR130a-3p e miR92a-3p.

Questi dati confermano che l'espressione dei miRNA durante l'insulto cutaneo di natura traumatico è da riferire ad un atto di regolazione della fase infiammatoria finalizzato ad inibire i segnali intracellulari attivati dalla produzione di citochine infiammatorie, anche in caso di lesioni che si sviluppano in tempi brevissimi, dell'ordine di pochi minuti.