

**DETERMINAZIONE DELL'ETA' DELLE LESIONI CUTANEE
PRESENTI SULLA CARCASSA DI SUINO TRAMITE
L'UTILIZZO DI UNO SPETTROFOTOMETRO E CONFRONTO
CON I DATI OTTENUTI DALLE ANALISI DI ESPRESSIONE
GENICA, ISTOLOGIA E ATTIVITA' ENZIMATICA**

***ASSESSMENT OF THE AGE OF SKIN LESIONS ON PIG
CARCASS THROUGH THE USE OF A SPECTROPHOTOMETER
AND ITS RELATIONSHIPS WITH GENE EXPRESSION,
HISTOLOGY AND ENZYMATIC ACTIVITY PARAMETERS***

VITALI M.^{1*}, CONTE S.^{2,5}, LESSARD M.², DESCHÊNE K.²,
BENOIT-BIANCAMANO M.O.³, CELESTE C.⁴, MARTELLI G.¹, SARDI L.¹,
GUAY F.⁵, FAUCITANO L.²

¹Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, I-40064 Ozzano dell'Emilia, Italy; ²Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke Research and Development Centre, Sherbrooke, QC J1M 0C8, Canada; ³Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; ⁴Department of Veterinary Biomedicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; and ⁵Department of Animal Science, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada.

Key words: analisi colorimetrica, carcassa suina, età delle lesioni cutanee.

Key words: pig carcass, skin lesion age, color assessment.

Riassunto: Le lesioni cutanee presenti sulla carcassa suina sono indice di scarso benessere animale e causa di perdita di valore della carcassa. Distinguere l'età delle lesioni consentirebbe di identificare i fattori di rischio e di prevenirli. Scopo dello studio è stimare l'età delle lesioni cutanee sulla carcassa suina attraverso l'analisi colorimetrica e di confermare i risultati con parametri biologici. 96 suini sono stati mescolati 4 volte nei 3 giorni antecedenti la macellazione e 80 lesioni sono state selezionate e classificate in 4 categorie di età. La cute integra è stata utilizzata come controllo. Dopo il dissanguamento, sono state prelevate 3 biopsie per ogni lesione e controllo per le analisi di espressione genica, istologiche e di attività enzimatica, poi il colore è stato valutato visivamente e strumentalmente mediante uno spettrofotometro. I risultati hanno dimostrato che i valori ΔL^* e Δa^* ottenuti con lo spettrofotometro distinguevano lesioni <7h o >25 h di età ($P < 0,05$). L'espressione dei geni *CCL2*, *IL6*, *ITGA3*, *MMP1* e *SERPINE1* era maggiore ($P < 0,05$) in lesioni <7 h di età, mentre *TIMP1* era maggiore ($P < 0,05$) in lesioni >25h di età. L'istologia ha dimostrato che la gravità della risposta infiammatoria era correlata con l'età delle lesioni (minor punteggio in lesioni <7h e maggior punteggio in lesioni >25h; $P < 0,05$). Concludendo, lo spettrofotometro potrebbe essere una metodica applicabile al macello per distinguere tra lesioni molto recenti o di almeno un giorno.

Abstract: The presence of lesions on the pig carcass is an indicator of poor animal welfare and downgrades the carcass value. Assessing the age of lesions on the carcass may help to identify risk factors and ultimately to prevent their occurrence. The aim of this study was to assess the age of lesions on pig carcasses through spectrophotometric color evaluation

and to relate the results with biological parameters. 96 barrows were mixed 4 times over 3d before slaughter and 80 lesions were selected to define 4 age categories. Nonlesioned skin was used as a control. At slaughter, 3 biopsies per lesion and control skin were taken immediately after bleeding for analyses of gene expression, histology, and enzyme activity. The number of lesions was counted on each carcass, and the color was assessed visually and instrumentally through a spectrophotometer. Results indicated that the spectrophotometer ΔL^* and Δa^* values variation allowed the identification of <7h or >25h old lesions ($P < 0.05$). The expression of *CCL2*, *IL6*, *ITGA3*, *MMP1*, and *SERPINE1* genes was higher ($P < 0.05$) in <7h old lesions, while *TIMP1* gene expression was higher ($P < 0.05$) in <25h old lesions. The histology showed that the severity of inflammation was correlated with the age of the lesion (lower score in <7h old lesions and higher score in >25h old lesions; $P < 0.05$). To conclude, the spectrophotometric assessment of lesions appears to be a reliable method to discriminate between fresh and older lesions on the carcass.

INTRODUZIONE

La presenza di lesioni cutanee è un *animal-based criteria* utilizzato per la valutazione del benessere animale (Welfare Quality, 2009), nonché un problema economico in quanto causa di una perdita di valore della carcassa (MLC, 1985) e di un maggiore costo di manodopera (Faucitano, 2001). Cause predisponenti l'insorgenza di lesioni cutanee sono dovute a condizioni e pratiche di allevamento sfavorevoli tra cui il mescolamento degli animali (Faucitano, 2001). Le lesioni vengono correntemente valutate utilizzando delle scale colorimetriche (MLC, 1985) o attraverso la conta del numero e della tipologia di lesione (ITP, 1996; Welfare Quality, 2009). Attualmente non esistono infatti metodi affidabili per stimare l'età delle lesioni nei suini. E' noto che l'evento traumatico può avvenire in ogni fase del processo pre-macellazione (Aaslyng et al., 2013), pertanto riuscire a risalire al momento in cui una lesione è stata inflitta potrebbe essere utile per prevenire o ridurre l'occorrenza. Il metodo comunemente utilizzato per valutare l'età delle lesioni al macello è quello visivo (Rocha et al., 2013); tuttavia questo metodo è suscettibile all'errore umano (Scafide, 2012). La determinazione oggettiva dell'età delle lesioni è stata studiata in diverse specie di animali di allevamento (Hamdy et al., 1957; Strappini et al., 2009; Munro and Munro, 2013) e in medicina forense su uomo e modelli animali (Wang et al., 2001; Gallant-Behm and Hart, 2006; Kondo and Ishida, 2010; Barington and Jensen, 2016a; b) attraverso l'analisi del colore utilizzando uno spettrofotometro, con tecniche di biologia molecolare e analisi istologiche e istochimiche. Nonostante vi sia la necessità di una metodologia affidabile in grado di determinare l'età delle lesioni cutanee sulla carcassa di suini al macello (Barington and Jensen, 2013), non esistono ad oggi metodi applicabili alle condizioni del settore suinicolo. L'obiettivo di questo studio è quello di sviluppare un metodo colorimetrico oggettivo, utilizzabile in sede di macellazione, in grado di determinare l'età delle lesioni sulla carcassa di suino e in relazione con i risultati ottenuti da indicatori biologici quali l'espressione genica, l'istologia e l'attività enzimatica.

MATERIALI E METODI

Le procedure sperimentali utilizzate sono state approvate dall'*institutional animal care committee* dell'Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC) Sherbrooke Research and Development Centre (Sherbrooke, QC, Canada) secondo quanto previsto dalla vigente normativa del Canadian Council on Animal Care (CCAC, 2009).

Animali e gestione

Un totale di 96 suini castrati (Piètrain x [Large White x Landrace]) sono stati suddivisi in 8

box di 12 suini ciascuno (4 replicati di 2 box ciascuno; $124,2 \pm 1,7$ kg di peso medio). I suini di ogni replicato, sono stati mescolati 3 volte nei 3 giorni prima della macellazione: 2 volte nella porcilaia (2 giorni prima della macellazione e il giorno prima della macellazione) e 1 volta durante il trasporto. Il primo mescolamento consisteva nel raggruppare 6 suini del primo box con 6 del secondo per creare 2 nuovi gruppi di 12 suini ciascuno. Il secondo mescolamento consisteva nel mescolare le restanti metà dei due box iniziali, che non si erano mai incontrate. Nel terzo mescolamento tutti i suini (24) venivano riuniti assieme e rimanevano assieme sino alla macellazione. Le lesioni sono state rilevate 3 h prima e dopo ciascun mescolamento da 2 osservatori addestrati, seguendo le indicazioni presenti nel protocollo Welfare Quality (Welfare Quality, 2009). Contemporaneamente, le lesioni di tutti i suini sono state mappate in entrambi i lati del corpo utilizzando una riproduzione su carta, con un colore diverso per ciascuna osservazione (6 osservazioni in totale, effettuate prima e dopo ogni mescolamento) allo scopo di tenere traccia del momento in cui ciascuna lesione è stata provocata. Le lesioni considerate nello studio erano derivanti da morsicatura o monta, caratterizzate da una forma a virgola o da un lungo graffio rispettivamente, in quanto rappresentative della tipologia di lesioni maggiormente rinvenibili sulle carcasse al macello (Varón-Álvarez et al., 2014). Ciascuna lesione selezionata era costituita da due graffi paralleli di almeno 2,5 cm di lunghezza e 4 mm di spessore. Subito prima della macellazione sono state selezionate 80 lesioni, distribuite nelle 4 categorie di età (20 lesioni/categoria) come segue: T1 (<7 h), T2 (7–25h), T3 (25–30h), e T4 (49–54h). La categoria di ciascuna lesione è stata calcolata in base al tempo intercorso tra la macellazione (T0) e il primo momento in cui la lesione è stata osservata. Le lesioni T1 corrispondevano quindi a lesioni recenti avvenute tra il carico e la macellazione, mentre le altre corrispondevano a lesioni avvenute durante il mescolamento in porcilaia. I suini sono stati tenuti a digiuno nelle 12 h prima della macellazione e poi trasportati in un macello distante 45 min dalla porcilaia. Al macello i suini sono rimasti in attesa per circa 3,5 h (escludendo 1 h di ispezione della cute dopo lo scarico), storditi tramite elettricità e macellati per iugulazione.

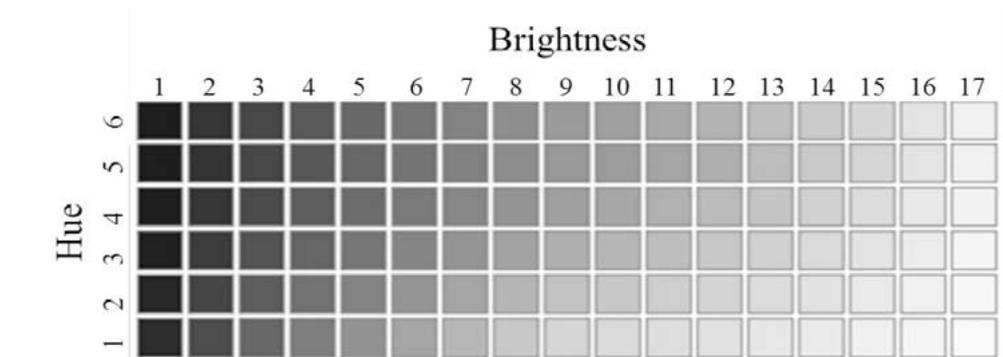
Raccolta dei campioni e misurazioni al macello

Immediatamente dopo il dissanguamento, da ciascun suino sono state prelevate 3 biopsie per ciascuna lesione, campionate in uno dei 2 graffi paralleli di cui ciascuna lesione era composta (80 lesioni in 4 categorie di età = 20 lesioni/categoria) più un controllo per ciascun suino, costituito da cute integra e prelevato nell'area attorno a quella della lesione, utilizzando un *punch* per biopsie di 4 mm (Integra Miltex, York, PA). Un campione per le analisi istologiche è stato immerso in formalina 10% mentre 1 campione per le analisi enzimatiche è stato immerso in un reagente O.C.T. (*optimum cutting temperature*) e successivamente congelato in azoto liquido e conservato a -80°C . Infine il terzo campione è stato immediatamente congelato in azoto liquido e conservato a -80°C in attesa dell'estrazione dell'mRNA e successive analisi di real-time PCR.

Nella cella frigo, il numero di lesioni è stato contato utilizzando una versione riadattata del Welfare Quality protocol for Pigs (Welfare Quality, 2009), escludendo le orecchie dal conteggio in quanto erano state rimosse durante la macellazione. I danneggiamenti della cute causati dai processi di macellazione (es. flambatura) sono stati esclusi dal conteggio. Le carcasse sono state classificate utilizzando una scala da 0 (max 4 lesioni nel corpo intero) a 2 (> 11 lesioni in 2 regioni del corpo o più di 15 lesioni in una regione). Il colore è stato valutato visivamente sulle lesioni e sul controllo utilizzando una scala colorimetrica (Figura 1) e ciascuna lesione è stata fotografata, per una successiva validazione. Il colore è stato poi misurato strumentalmente 3 volte in 3 posizioni diverse lungo ogni lesione (nel secondo graffio, dove non erano presenti le biopsie) così come nell'area di cute non lesa attorno

alla lesione, utilizzando uno spettrofotometro CM700d (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan). Lo strumento è stato settato come segue: 8° viewing angle; 2° observer angle; D65 illuminant; specular component included (SCI); diametro dell'area di misurazione di 3 mm; colore CIE L*a*b*.

Figura 1. Scala colorimetrica utilizzata per la valutazione visiva del colore.



Analisi istologiche e istochimiche

Istologia. Le biopsie sono state tagliate in 2, processate come da routine e immerse in paraffina (TissuePrep 2 Micron; Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Le sezioni di 4 µm di spessore sono stati deparaffinizzate e quindi fissate con *hematoxylin-eosin-phloxin-saffron* (HEPS) per valutare i seguenti 4 parametri su derma e epiderma: infiammazione; erosione/ulcerazione; emorragia e necrosi.

Fosfatasi alcalina (ALPase). I campioni sono stati tagliati in sezioni da 4 µm utilizzando un criostato Leica CM3050S (Leica Biosystems, Concord, ON, Canada) a -24°C. Per le analisi è stato utilizzato il colorante Alkaline Phosphatase Staining (Red) Kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA). I vetrini sono stati poi colorati con StemTAG™ AP Staining solution e incubati a temperatura ambiente per 15-30 min, al buio e poi addizionati con 0,1% di Fast Green. La fosfatasi alcalina appariva di colore rosso su di uno sfondo azzurro.

Adenosin trifosfatasi (ATPase). I campioni sono stati tagliati in sezioni di 4 µm nel criostato a -24°C e portati a pH 9,4 secondo il metodo descritto da Bancroft (1975). I vetrini sono stati addizionati con Harris hematoxylin per 25 s e quindi sciacquati con acqua distillata. L'asciugatura è stata fatta come segue: 80% alcool per 2 min; 95% alcool per 2 min; 100% alcool per 2 min e tuluolo per 5 min. I vetrini sono stati caricati utilizzando un Leica CV 5000 automated cover slipper (Leica Biosystems, Concord, ON, Canada).

Analisi microscopica. L'analisi microscopica per l'HEPS e istochimica è stata effettuata utilizzando un microscopio ottico Olympus BX41 (Olympus America Inc., Melville, NY). Una magnificazione di 25 a 400 X è stata utilizzata quando appropriata. Per l'infiammazione, l'emorragia, ATPase epidermica, e ALPase del derma e dell'epidermide la seguente scala è stata utilizzata per descrivere le lesioni: 0= assente; 1=minima; 2= media; 3= moderata; 4=grave. Per l'erosione/ulcerazione e la necrosi dell'epidermide questa scala è stata modificata in base alla superficie dell'epidermide affetta in ciascun campione, come segue: nessun valore = 0% dell'epidermide; 1= <25%; 2= 25-50%; 3= > 50-75%; 4= >75-100%.

Espressione genica

Un campione (30 mg) è stato prelevato a seguito di omogeneizzazione della biopsia con buffer RTL e mercaptoetanolo. L'RNA totale è stato estratto utilizzando il RNA Fibrous Mini Kit (Quiagen, Hamburg, Germany) ed eluto in 30 µl di acqua nucleasi-free. Tutti i campioni sono stati quantificati utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Valori di RIN (RNA integrity number) >8 confermavano che la qualità dell'RNA era adeguata per l'analisi di real-time PCR. La sintesi di cDNA è stata fatta a partire da 1 µg di RNA utilizzando il RT2 First Strand Kit (Qiagen, Hamburg, Germany) per ottenere 20 µl di soluzione di cDNA diluita 1:15 µl in acqua nucleasi-free. La PCR real-time è stata eseguita utilizzando Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Framingham, MA) per valutare il livello di mRNA per i 12 geni elencati nella Tabella 1. Di questi ~~geni~~, 10 erano geni target (*CCL2*, *IL6*, *ITGA3*, *SERPINE1*, *MMP1*, *TIMP1*, *TNFα*, *IL8*, *IL10*, and *COX2*), precedentemente selezionati in uno studio preliminare a partire da un gruppo di 94 geni analizzati in base alla loro efficienza nella determinazione dell'età delle lesioni (Vitali et al., 2017). I primer sono stati disegnati utilizzando sequenze di mRNA suino per tutti i geni di interesse (Tabella 1). La reazione di amplificazione della RT-PCR iniziava con 10 min di attivazione enzimatica a 95°C, seguita da 40 cicli di 15 s di denaturazione a 95°C e 1 min di *annealing* e estensione a 60°C. Ogni campione è stato analizzato in triplicato. La quantificazione è stata calcolata per ciascuno dei 10 geni target utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) utilizzando i geni *B2M* e *HPRT1* come geni *housekeeping*, e la cute non lesa come controllo.

Tabella 1. Primer utilizzati nel presente studio.

<i>Gene</i>	<i>Primer</i>	<i>Diluzione, nM</i>	<i>Sequence number</i>
<i>CCL2</i>	F CTGCACCCAGGTCCTTGCCC	300	NM_214214
	R CTGCTGGTGACTCTTCTGTAG	300	
<i>IL6</i>	F GGAAATGTCGAGGCTGTGCAGATT	300	NM_214399.1
	R GGTGGTGGCTTTGTCTGGATTCTT	300	
<i>COX2</i>	F AAGCGAGGACCAGCTTTCACCAAA	300	NM_214321.1
	R GCGCAGTTTATGCTGTCTCTCCAA	300	
<i>ITGA3</i>	F ATCATTTGCGAGCTGGGGAAC	50	XM_005668880
	R CAGCTGCGCCTGGAGTTC	50	
<i>MMP1</i>	F TGCCAAATGGACTTCAAGCTGC	300	NM_001166229
	R GATCTGTGGATGTCCTTGGGG	300	
<i>TIMP1</i>	F ACCAAGATGTTCAAAGGGTTCAAT	300	NM_213857
	R TCCGCAGACGCTCTCCAT	300	
<i>IL8</i>	F AGAACTGAGAAGCAACAACACAG	300	NM_213867.1
	R CACAGGAATGAGGCATAGATGTAG	300	
<i>TNFα</i>	F CACTGACCACCACCAAGAATTGGA	300	NM_214022.1
	R CATTCAGATGTCCCAGGTTGCAT	300	
<i>SERPINE1</i>	F CCACCCCGACGGCCATTAC	300	NM_213910.1
	R TGGTGAGGGCGGAGAGAGGC	300	
<i>IL10</i>	F GATATCAAGGAGCACGTGAACTC	300	NM_214041.1
	R GAGCTTGCTAAAGGCACTCTTC	300	
<i>B2M</i>	F GGATCAGTATAGCTGCCGCG	300	NM_213978.1
	R TCTGTGATGCCGTTAGTGG	300	
<i>RPS18</i>	F CATGTGGTGTGAGGAAAGCA	300	NM_213940.1
	R TTGGCGAGGATTCTGCATAAT	150	

Analisi visiva del colore. Valori delta (Δ hue e Δ brightness) sono stati calcolati come la differenza di colore tra le lesioni e il controllo. I dati sono stati analizzati con SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC), utilizzando il test di Kruskal-Wallis, inserendo le 4 categorie di età nel modello.

Analisi spettrofotometrica del colore. I valori derivanti dalla media di 3 misurazioni di ogni lesione, espressi per parametri L^* , a^* , b^* sono stati calcolati e rapportati con i valori ottenuti sul controllo (cute non lesionata) ottenendo i valori delta (ΔL^* , Δa^* , and Δb^*). I valori delta sono stati analizzati utilizzando la PROC MIXED di SAS includendo la categoria di età della lesione come fattore fisso. Le comparazioni multiple sono state fatte correggendo i dati con il metodo di Tukey. Inoltre, l'accuratezza delle misure spettrofotometriche per la determinazione dell'età delle lesioni è stata valutata come descritto da Parikh et al. (2008). Brevemente, questo metodo consisteva nel comparare la classificazione dell'età delle lesioni ottenute con un dato parametro (es. ΔL^*) con la reale età delle lesioni (basata sull'osservazione diretta della loro comparsa nei suini vivi dopo ciascun mescolamento). I valori di sensibilità, specificità e il valore predittivo positivo (PPV; ovvero la probabilità che una lesione sia realmente recente quando il valore è superiore al valore soglia) sono stati calcolati per selezionare il migliore valore soglia, sopra o sotto il quale una lesione sarebbe stata correttamente classificata come recente o vecchia. Maggiore era la somma di sensibilità, specificità e il PPV, maggiormente accurata era la soglia per la classificazione di età. Il valore predittivo negativo (NPV, ovvero la probabilità che la lesione fosse vecchia quando l'indicatore è sotto il valore soglia) di un indicatore è stato calcolato (Parikh et al., 2008).

Istologia. Per ragioni tecniche, i dati istologici ottenuti da 2 lesioni nella categoria T4 mancavano. Per ridurre il numero di categorie ordinali e aumentare il potere statistico le classi sono state raggruppate come segue: punteggio 0 = classe 0; punteggio 1 = classi 1-2; punteggio 2 = classi 3-4. La relazione tra i punteggi di ciascun parametro e le classi di età sono stati valutati utilizzando il test di associazione Cochran–Mantel–Haenszel per categorie ordinali (*row mean score statistic*). Nel caso di associazione significativa, le comparazioni multiple sono state effettuate correggendo il valore di P con il metodo Bonferroni ($P < 0,008$).

Istochimica dell'attività enzimatica. I valori delta sono stati calcolati come differenza tra i punteggi delle lesioni e quelli del controllo (Δ ATPase, Δ ALPaseE, and Δ ALPaseD). I valori delta sono stati quindi raggruppati come punteggio 0 se il delta era 0, punteggio 1 se il delta era 1 o 2, e punteggio 2 se il delta era 3 o 4. La relazione tra il punteggio di ciascun enzima e le categorie di età delle lesioni sono state valutate tramite il test di Cochran–Mantel–Haenszel per associazioni tra categorie ordinali (*row mean score statistic*).

Espressione genica. Per ragioni tecniche, 1 lesione nella categoria T3 non è stata analizzata. Il valore di *fold change* per ciascun gene espresso e portato a distribuzione normale è stato analizzato utilizzando la PROC MIXED di SAS inserendo la categoria di età come fattore fisso. Le comparazioni multiple sono state fatte utilizzando l'aggiustamento di Tukey–Kramer.

Analisi multivariata. L'analisi fattoriale multivariata per dati misti (FAMD) è stata effettuata utilizzando la procedura PRINCOMP di SAS su variabili selezionate dalle analisi precedenti perché relazionate con l'età delle lesioni, al fine di analizzare le relazioni tra queste variabili e le categorie di età delle lesioni. Le variabili categoriche sono state trasformate in tabelle

separate e incluse nell'analisi PCA insieme alle matrici centrate e scalate delle variabili numeriche. Per tutte le analisi, l'unità sperimentale era la lesione cutanea (n=80). Valori di $P < 0,05$ sono stati scelti come limite per la significatività statistica in tutti i test mentre valori di $P < 0,10$ sono stati considerati come una tendenza.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Punteggio lesioni. In base quanto osservato da Hamdy et al. (1957) il numero di lesioni cutanee può influenzare la velocità di riposta fisiologica nella guarigione delle ferite. In questo studio, tutte le carcasse utilizzate presentavano un punteggio (relativo al numero di lesioni) elevato ($pt = 2$) pertanto questo fattore non ha influenzato i risultati del presente studio, in quanto le carcasse si presentavano omogenee.

Analisi colorimetrica. Nel complesso, l'analisi visiva del colore ha mostrato che le lesioni erano più scure ($-\Delta$ brightness; $P|t| < 0,001$) e più rosse ($-\Delta$ hue; $P|t| < 0,001$) rispetto alla cute integra (Tabella 2). Tuttavia, la determinazione visiva del colore non è stata in grado riconoscere differenze imputabili all'età delle lesioni ($P > 0,10$), confermando l'inaccuratezza di questo metodo nel determinare l'età delle lesioni, in accordo con quanto riportato alcuni studi (Hughes et al., 2004; Barington and Jensen, 2013). La determinazione del colore tramite lo spettrofotometro ha dimostrato che le lesioni erano più scure ($-\Delta L^*$ value; $P|t| < 0,001$), più rosse ($+\Delta a^*$ value; $P|t| < 0,001$) e più gialle ($+\Delta b^*$ value; $P|t| < 0,001$) rispetto alla cute non lesa (Tabella 2). Contrariamente dalla determinazione visiva però, lo spettrofotometro è riuscito ad individuare delle differenze di colore tra le categorie di lesioni. Basandosi sui parametri ΔL^* e Δa^* infatti, le lesioni T1 (<7h) erano più scure e più rosse rispetto alle lesioni T3 ($P = 0,01$ in entrambi i valori colorimetrici) e T4 ($P < 0,001$ and $P = 0,003$ per ΔL^* e Δa^* , rispettivamente); infine è stata osservata una tendenza per i valori ΔL^* e Δa^* tra T1 e T2 ($P = 0,06$ e $P = 0,08$, rispettivamente). Al contrario, l'indicatore del colore giallo (Δb^*) non era diverso tra le categorie di lesioni ($P > 0,10$). Quest'ultimo risultato non è sorprendente, in quanto la componente del giallo, risultante dalla degradazione dell'emoglobina in bilirubina nelle ultime fasi della guarigione (Hughes et al., 2004; Mimasaka et al., 2010) è stata utilizzata come indicatore di lesioni più vecchie di quelle considerate nel presente studio. Infatti, il colore giallo è stato osservato intorno a 72 h in contusioni nell'uomo adulto (Langlois, 2007) o in contusioni di bambini dopo le 3-5 sett (Mimasaka et al., 2010). Nel complesso, la valutazione spettrofotometrica del colore sembra essere un metodo utile per distinguere tra lesioni recenti o vecchie (<7 h vs. >25 h) a conferma di quanto osservato in precedenti studi di medicina forense (Hughes and Langlois, 2010; Mimasaka et al., 2010; Grossman et al., 2011).

Nel presente studio, l'efficienza dei parametri ΔL^* o Δa^* , intesi come indicatori dell'età delle lesioni, è stata validata utilizzando un test diagnostico. La migliore soglia utilizzata per il parametro ΔL^* era -15. Quando il valore ΔL^* era più alto della soglia, la lesione veniva considerata > di 7 h. In questo caso, il test diagnostico ha presentato una sensibilità di 0,40, una specificità di 0,95, un PPV di 0,73, un NPV di 0,83. La migliore soglia individuata per Δa^* era 15. Quando il valore di Δa^* era inferiore alla soglia veniva considerato indicatore di lesioni >7 h e il test diagnostico presentava una sensibilità di 0,50, una specificità dell'0,88, un PPV di 0,59 e un NPV di 0,84. Sulla base di questo test, si può concludere che c'era il 73% di possibilità che una lesione fosse vecchia se il ΔL^* era maggiore di -15 e il 59% di possibilità che la lesione fosse vecchia se il Δa^* era minore di 15. In entrambi i parametri considerati, la sensibilità era bassa, pertanto il test è risultato poco sensibile nella distinzione certa tra lesioni recenti e vecchie. Questo è imputabile alla grande variabilità dei dati. Fonti

di variabilità potrebbero essere differenze nella profondità della lesione, la posizione della lesione sulla carcassa e lo spessore del grasso, influenzando così il cambiamento di colore e la velocità del processo di guarigione (Mimasaka et al., 2010). Inoltre anche la variabilità individuale nel processo di degradazione dell'emoglobina nel tempo, dovrebbe essere presa in considerazione (Grossman et al., 2011).

Tabella 1. Effetto dell'età delle lesioni valore delta del colore (colore lesione-colore controllo) valutati visivamente o con l'utilizzo dello spettrofotometro.

Metodo	Categorie di età ¹				se	P-value
	T1	T2	T3	T4		
<i>Visivo</i>						
Δbrightness	-4,50 (-6,50; -3,00)	-4,00 (-5,00; -3,00)	-3,00 (-4,00; -2,50)	-4,00 (-5,00; -3,00)	-	0,34
Δ hue	-1,50 (-2,00; -1,00)	-1,00 (-2,00; -1,00)	-1,00 (-2,00; -1,00)	-1,00 (-2,00; -1,00)	-	0,87
<i>Spettrofotometrico</i>						
ΔL*	-13,16 ^{aA}	-9,05 ^{abB}	-8,22 ^b	-6,63 ^b	1,141	0,001
Δa*	15,11 ^{aA}	10,62 ^{abB}	9,34 ^b	8,43 ^b	1,317	0,003
Δb*	5,85	4,99	5,38	5,04	0,589	0,71

¹Categorie di età: T1= < 7 h; T2= 7-25 h; T3=25-30 h; T4= 49-54 h

^{a-c} $P < 0,05$; ^{A-B} $P < 0,10$

Istologia e attività enzimatica. Non è stata trovata nessuna differenza nei punteggi necrosi ed emorragia tra le categorie di lesioni ($P > 0,10$; Tabella 3), mentre il punteggio relativo all'inflammatione ha mostrato una relazione con l'età delle lesioni ($P < 0,001$), presentando una maggiore proporzione di lesioni con il punteggio 2, riscontrato nelle lesioni T3 e T4 (> 25 h) nel confronto con T1 (<7h) ($P = 0,001$ e $P < 0,001$, rispettivamente). Un risultato simile è stato riportato in ferite in uomini adulti di 33-49 h (Takamiya et al., 2008) e in contusioni cutanee di topi, agnelli e capretti comprese tra 24 e 71 h (McCausland and Dougherty, 1978; Takamiya et al., 2005). Anche il punteggio erosione/ulcerazione ha presentato una tendenza ($P = 0,07$) con punteggi più elevati in T3 e T4 a confronto con T1 (Tabella 3). Non è stata trovata nessuna associazione per i parametri ATPase dell'epidermide e ALPase e ATPase nel derma tra le lesioni e il controllo ($P > 0,1$, Tabella 3), suggerendo che l'utilizzo dell'istochimica applicata all'attività enzimatica non sia appropriata per la valutazione dell'età delle lesioni cutanee sulla carcassa di suino. Questo potrebbe verosimilmente dipendere da una presenza non costante di ATPase and ALPase nei vetrini, come precedentemente riportato da (Betz, 1994) e (Cecchi, 2010). Anche se non sono presenti molti studi sull'utilizzo di ALPase come indicatore del processo di guarigione delle ferite, questo enzima è stato usato in alcuni studi come indicatore per datare le lesioni cutanee (Abe et al., 2001; Hawkins and Abrahamse, 2007). Una maggiore presenza di ATPase e ALPase è stata riportata in ferite cutanee di uomo di 1h e 4-8 h, rispettivamente, in grado di persistere sino a 16 h (Raekallio, 1972; Dettmeyer, 2011). Psaroudakis et al. (2001) ha riscontrato un'augmentata presenza di ATPase in ferite di coniglio da 2 a 20h dopo la lesione e di ALPase da 3,5 h sino a 32 h dopo la lesione. Le differenze osservate tra gli studi possono essere dovute a vari fattori, tra cui la tipologia di lesione (graffi o ferite) o la struttura della cute, che è specie-specifica.

Tabella 2. Variazione dei punteggi istologici e dei valori delta (lesione-controllo) per l'attività enzimatica, in relazione alle categorie di età delle lesioni.

	N	Categoria di età ²	Punteggio ¹			P-value
			0	1	2	
Istologia						
Necrosi	78	T1	25,00	60,00	15,00	0,16
		T2	10,00	50,00	40,00	
		T3	15,00	55,00	30,00	
		T4	11,11	44,44	44,44	
Erosione/ulcerazione	77	T1	50,00	35,00	15,00	0,07
		T2	15,00	50,00	35,00	
		T3	26,32	42,11	31,58	
		T4	16,67	44,44	38,89	
Infiammazione	78	T1	45,00	55,00	0,00	<0,001
		T2	20,00	50,00	30,00	
		T3	10,00	55,00	35,00	
		T4	5,56	50,00	44,44	
Emorragia	78	T1	15,00	75,00	10,00	0,50
		T2	25,00	65,00	10,00	
		T3	0,00	95,00	5,00	
		T4	11,11	72,22	16,67	
Attività enzimatica						
ΔALPaseE ³	79	T1	50,00	50,00	-	0,16
		T2	84,21	15,79	-	
		T3	60,00	40,00	-	
		T4	60,00	40,00	-	
ΔALPaseD ⁴	79	T1	40,00	45,00	15,00	0,76
		T2	57,89	21,05	21,05	
		T3	40,00	55,00	5,00	
		T4	35,00	45,00	20,00	
ΔATPase ⁵		T1	85,00	15,00	-	0,73
		T2	84,21	15,79	-	
		T3	94,74	5,26	-	
		T4	85,00	15,00	-	

I valori rappresentano la percentuale di lesioni in ogni categoria di età in base al punteggio attribuito per ciascuna analisi. Il P-value è stato ottenuto con il Cochran-Mantel-Haenszel test (*row mean score*).

¹ Punteggio infiammazione e emorragia: 0 = assente; 1 = minimo -medio; 2 = moderato-severo. Punteggio necrosi/erosione: 0 = 0%; 1 = < 25% - <50%; 2 = 50-100% dell'epidermide. Per gli enzimi: 0 = valore delta di 0; 1 = valore delta 1-2; 2 = valore delta 3- 4.

² Categorie di età: T1 = < 7 h; T2 = 7-25 h; T3 = 25-30 h; T4 = 49-54 h

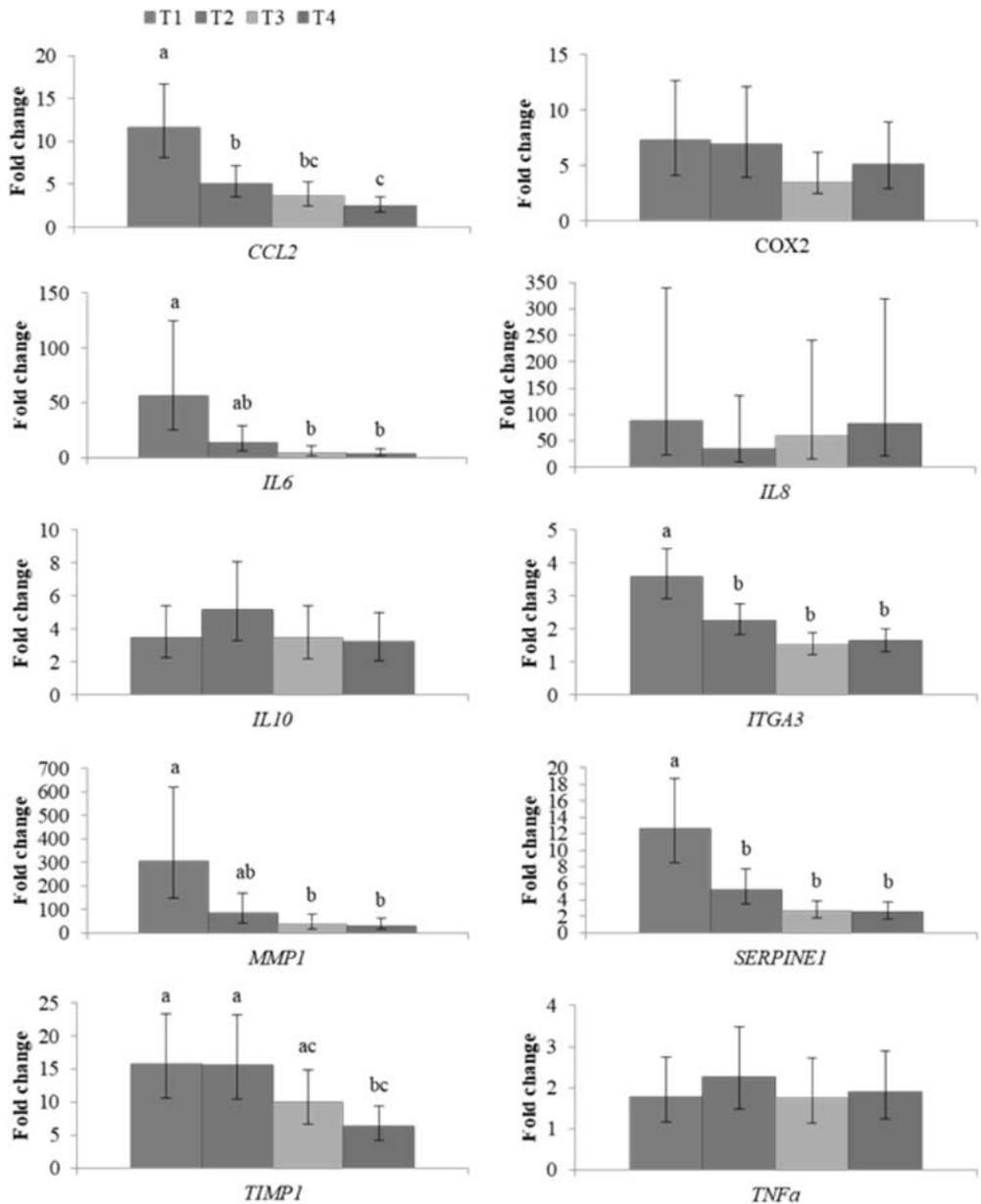
³ ALPaseE= Fosfatasi alcalina nell'epidermide

⁴ ALPaseD= Fosfatasi alcalina nel derma

⁵ ATPase= Adenosin trifosfatasi nell'epidermide

Espressione genica. Dei 10 geni testati, 6 (*CCL2*, *IL6*, *ITGA3*, *SERPINE1*, *MMP1*, e *TIMP1*) hanno mostrato un livello di espressione relazionato all'età delle lesioni, con un valore di *fold change* più elevato nelle lesioni T1 e progressivamente decrescente nelle lesioni più vecchie (categoria di età: $P < 0,05$, Figura 2). Al contrario, gli altri 4 geni (*TNF α* , *IL8*, *IL10* e *COX2*) erano ugualmente sovraespressi, pertanto non vi era una del loro livello di espressione nel tempo ($P > 0,10$). Quando comparate con le lesioni T2, le lesioni T1 presentavano un maggiore *fold change* nei geni *CCL2* ($P = 0,008$), *ITGA3* ($P = 0,01$), e *SERPINE1* ($P = 0,01$). Inoltre, un maggiore ($P < 0,001$) *fold change* è stato osservato nelle lesioni T1 per i geni *CCL2*, *IL6*, *ITGA3*, *MMP1*, e *SERPINE1* se comparati con T3 e T4. Nessuna differenza è stata trovata nell'espressione di questi geni tra le categorie T4 e T3 ($P > 0,10$). Un valore diverso di espressione è stato trovato per il gene *TIMP1* quando comparato con gli altri geni, con un *fold change* più elevato ($P = 0,01$) nelle lesioni T1 e T2 se comparato con T4. Nessuna differenza è stata osservata nell'espressione di questo gene tra T1 e T2 ($P > 0,10$). Fatta eccezione di *CCL2*, *IL6* e *MMP1*, l'espressione dei geni testati in questo studio non è mai stato utilizzato prima per stimare l'età delle lesioni in nessuna specie, inclusi gli umani. *CCL2* è una chemiochina principalmente coinvolta nella risposta infiammatoria, che regola il reclutamento di monociti/macrofagi (Werner and Grose, 2003; Kondo and Ishida, 2010). La maggiore espressione di *CCL2* riscontrata in lesioni recenti (T1) è in accordo con quanto riscontrato in ferite cutanee di topi (Kondo and Ishida, 2010; Wang et al., 2015).

Figura 3. Espressione genica per le quattro categorie di età delle lesioni cutanee. (^{a,b}P < 0,05). Le barre di errore rappresentano i valori massimi e minimi del *fold change*. T1= < 7h; T2= 7-25 h; T3=25-30 h; T4= 49-54 h.

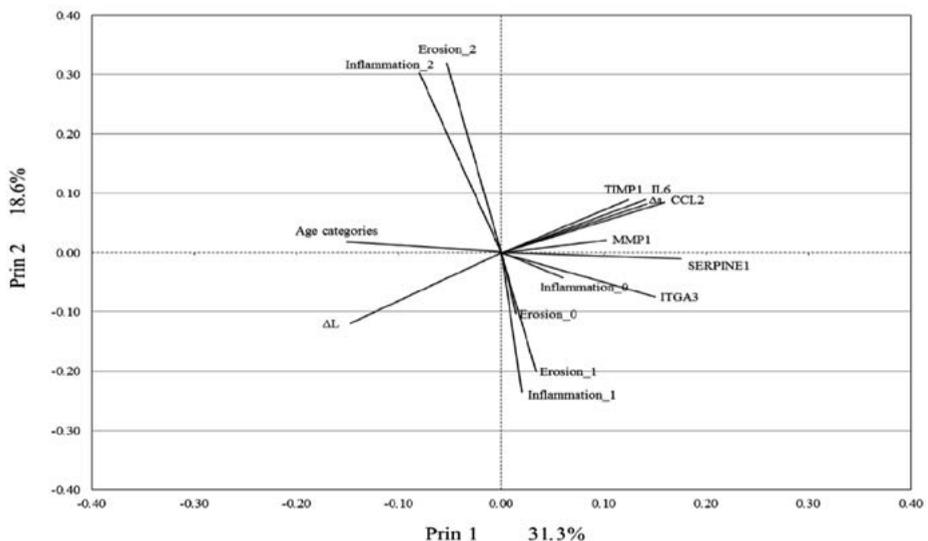


La maggiore espressione di *IL6*, una citochina proinfiammatoria che svolge un ruolo essenziale e precoce nella risposta di guarigione, (Werner and Grose, 2003; Lin et al., 2003), è in accordo con quanto osservato anche da Stato e Oshima (2000) in ferite cutanee di topo. Questi risultati sono in contrasto con quelli di Wang et al. (2015), il quale ha riportato il picco di espressione di questo gene a 1 giorno dalla lesione, in uomini e topi. Infine *MMP1*, coinvolto nelle fasi di infiammazione, processo di degradazione della matrice, di migrazione cellulare (Rohani and Parks, 2015) rimodellamento del tessuto e angiogenesi (Gallant-Behm and Hart, 2006; Wang et al., 2015) è stato il gene maggiormente espresso in questo studio. Madlener et al. (1998) ha riportato un aumento di espressione di questo gene in ferite di topo, ma solo a partire da 1 giorno dopo la lesione. Il presente studio fornisce la prima evidenza che l'espressione di questo gene aumenta in lesioni più recenti (<7h). Studi precedenti riportano che *Itga3* e *Timp1* erano coinvolti nel processo di guarigione delle ferite in topi (Madlener et al., 1998; Reynolds et al., 2008). Un maggiore livello di proteasi della famiglia delle SERPIN è stato inoltre rilevato nell'essudato di ferite negli uomini (Eming et al., 2010). Il nostro studio ha chiaramente mostrato che il livello di espressione di questi geni era diverso in relazione al processo di guarigione nelle ferite cutanee. *SERPINE1* è conosciuto per essere coinvolto nella stimolazione di *MMP* e integrine (Li et al., 2003; Behm et al., 2012) che erano maggiormente espresse in lesioni T1 in questo studio. Inoltre le integrine sono anche coinvolte nell'attivazione di *TIMP*, un inibitore di *MMP* (Li et al., 2003; Behm et al., 2012), e sono risultate le maggiormente espresse in T3 rispetto agli altri geni misurati in questo studio. I geni *TNF α* , *IL8*, *IL10* e *COX2* erano tutti coinvolti nella risposta infiammatoria e regolatori delle altre fasi della guarigione delle ferite (Gilroy et al., 1999; Werner and Grose, 2003; Takamiya et al., 2008; Cecchi, 2010). Studi in suini e topi (Wang et al., 2001, 2015, 2016) riportano una maggiore espressione di *TNF α* in ferite profonde di 1a14 giorni di età. Una simile variazione nell'espressione non è stata vista per *IL10*, nonostante la sua espressione sia stimolata da *TNF α* (Wanidworanun and Strober, 1993). Tuttavia in anche letteratura sono stati osservati risultati molto differenti con picchi a 60 min (Ohshima and Sato, 1998), 3h e 3 giorni dopo la lesione (Sato et al., 1999). L'espressione di *IL8* e *COX2* è stata riportata sino a 4 giorni dopo la lesione in uomini (Engelhardt et al., 1998) e in ferite da incisione da 1 a 3 h in conigli (Bai et al., 2008). Nel presente studio, la mancanza di differenze nell'espressione nelle diverse categorie di età di *TNF α* , *IL8*, *IL10*, e *COX2* e la grande variazione nell'espressione di *IL8* all'interno di categorie di lesioni suggerisce che questi geni non siano adatti come marcatori per la determinazione dell'età delle lesioni. Complessivamente, la valutazione combinata dell'espressione di *MMP1*, *SERPINE1*, *IL6*, and *CCL2* potrebbe essere utile per distinguere tra lesioni recenti e vecchie (<7 h vs 25 h), mentre l'analisi dell'espressione di *TIMP1* potrebbe riuscire a distinguere tra lesioni <25 h e >49 h, nella carcassa di suino. Questi risultati confermano l'efficienza dell'analisi real-time PCR su mRNA per la valutazione dell'età delle lesioni, come riportato in altri studi (Kondo and Ishida, 2010). Tuttavia, nonché molto promettente, questo metodo potrebbe avere alcune limitazioni se applicato alle condizioni commerciali in quanto è complicato, lungo e dispendioso (Takamiya et al., 2008).

Analisi multivariata. Un approccio basato sull'analisi simultanea di molti fattori è considerato il migliore per sviluppare un metodo affidabile nella datazione delle lesioni (Cecchi, 2010). I fattori utilizzati nella FAMD sono stati selezionati dall'analisi dell'espressione genica (*TIMP1*, *IL6*, *CCL2*, *SERPINE1*, *ITGA3* e *MMP1*), dall'analisi spettrofotometrica del colore (Δa^* e ΔL^*), dall'istologia (i.e., inflammation and erosion) tra quelli maggiormente relazionati alle categorie di età delle lesioni. L'analisi multivariata dei parametri selezionati ha mostrato che la varianza nell'età delle lesioni può essere spiegata per il 49,9% dalla combinazione delle componenti Principale 1 (Prin 1) e Principale 2 (Prin 2)

come mostrato in Figura 3, attribuibile al processo di guarigione. L'altro 50,1% della varianza potrebbe essere dovuta ad altri fattori, come la gravità delle lesioni (Barington and Jensen, 2016b), la variabilità di risposta fisiologica individuale, le condizioni corporee dell'animale (es. il peso corporeo e lo spessore del grasso sottocutaneo), nonché la regione anatomica delle lesioni (Cecchi, 2010; Mimasaka et al., 2010; Grossman et al., 2011). La posizione delle variabili rispetto a Prin 1 e Prin 2 nell'immagine (Figura 3), mostra che le categorie di età delle lesioni sono negativamente associate all'espressione genica e al valore Δa^* dello spettrofotometro, indicando che maggiore è l'età delle lesioni, minore è l'espressione genica e il valore di Δa^* . In questo studio, le lesioni recenti erano infatti più rosse e presentavano un maggiore livello di espressione genica. La posizione opposta del vettore riguardante ΔL^* in relazione con il valore Δa^* e con tutti i vettori dell'espressione genica può essere spiegato dal valore negativo di L^* che aumenta mano a mano che il colore della lesione diventa scuro. Il punteggio 0 e 2 nel parametro infiammazione (assenza e moderato-severo, rispettivamente) erano negativamente e positivamente associati, rispettivamente, all'età delle lesioni, indicando che la risposta infiammatoria nel tessuto cutaneo aumenta all'aumentare dell'età delle lesioni. Nessuna relazione è stata trovata tra il punteggio 1 (minimo) e l'età della lesione, il che conferma la mancanza di variazione nella percentuale di lesioni che presentavano un minimo o medio livello di infiammazione nella comparazione tra categorie di lesioni (Tabella 3). Questi risultati suggeriscono che questo livello di infiammazione può essere maggiormente relazionato a fattori, quali la severità delle lesioni o la risposta fisiologica individuale, come precedentemente osservato da Barington and Jensen (2016b) in contusioni in suino. Riassumendo, il risultato dell'analisi multivariata mostra l'associazione positiva tra l'espressione di *TIMP1*, *IL6* e *CCL2* e il valore di Δa^* confermando il potenziale dell'analisi spettrofotometrica nella determinazione dell'età delle lesioni.

Figura 3. Analisi fattoriale per dati misti. I punteggi 0, 1 e 2 nei parametri Erosione e Infiammazione rappresentano ogni categoria di guarigione delle lesioni. Le categorie di età sono modificate come segue: 1 = < 7h; 2 = 7-25 h; 3=25-30 h; 4 = 49-54 h. Valori delta (D) indicano la differenza tra le lesioni e i controlli per i parametri colorimetrici L^* (lucentezza) and a^* (rosso).



CONCLUSIONI

La necessità conoscere i punti critici pre-macellazione al fine di implementare il benessere e la sostenibilità del settore delle carni suinicole è di attuale interesse e necessitano di sviluppare metodi in grado di determinare l'età delle lesioni sulle carcasse al macello. In questo studio, in base alla valutazione pre-macellazione delle lesioni cutanee, la determinazione dell'età delle lesioni rinvenute sulla carcassa sembra essere una tecnica pratica, veloce e affidabile per distinguere tra lesioni recenti (<7 h) verificatesi tra il trasporto e la macellazione, o più vecchie (>25 h) imputabili all'allevamento. Tuttavia, la grande variabilità nei risultati colorimetrici, probabilmente derivante da variazioni individuali nella composizione corporea (*i.e.* spessore del grasso sottocutaneo), non hanno consentito, in questo studio, di sviluppare un test diagnostico in grado di distinguere accuratamente le classi di età delle lesioni. Ulteriori ricerche sono necessarie per valutare l'impatto dei fattori di variabilità sulla misurazione spettrofotometrica del colore. L'analisi dell'espressione dei geni *MMP1*, *SERPINE1*, *IL6*, *ITGA3*, *TIMP1* e *CCL2* e la risposta infiammatoria nelle lesioni cutanee valutate al macello hanno supportato i risultati ottenuti con lo spettrofotometro. Questa relazione mostra il potenziale di queste tecniche per la validazione di metodi automatici oggettivi per la determinazione dell'età delle lesioni e l'utilità di questo tipo di analisi anche per scopi che vedono il suino come modello sperimentale per studi in medicina umana o forensi.

BIBLIOGRAFIA

- Aaslyng M.D., Brandt P. and Blaabjerg L. (2013) "Assessment and Incidence of Skin Damage in Slaughter Pigs." pp. 18–21. Proceedings of the 59th Intern. Congr. Meat Sci. Technol., Izmir, Turkey.
- Abe T., Abe Y., Aida Y., Hara Y. and Maeda K. (2001) "Extracellular matrix regulates induction of alkaline phosphatase expression by ascorbic acid in human fibroblasts." *J. Cell. Physiol.* 189, 144–151.
- Bai R., Wan L. and Shi M. (2008) "The time-dependent expressions of IL-1 β , COX-2, MCP-1 mRNA in skin wounds of rabbits." *Forensic Sci. Int.* 175, 193–197.
- Bancroft JD 1975. Histochemical techniques. Butterworths, London.
- Barington K. and Jensen H.E. (2013) "Forensic cases of bruises in pigs." *Vet. Rec.* 173, 526.
- Barington K. and Jensen H.E. (2016a) "A novel, comprehensive, and reproducible porcine model for determining the timing of bruises in forensic pathology." *Forensic Sci. Med. Pathol.* 12, 58–67.
- Barington K. and Jensen H.E. (2016b) "The impact of force on the timing of bruises evaluated in a porcine model." *J. Forensic Leg. Med.* 40, 61–66.
- Behm B., Babilas P., Landthaler M. and Schreml S. (2012) "Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing." *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 26, 812–820.
- Betz P. (1994) "Histological and enzyme histochemical parameters for the age estimation of human skin wounds". *Int. J. Legal Med.* 107, 60–68.
- Cecchi R. (2010) "Estimating wound age: looking into the future." *Int. J. Legal Med.* 124, 523–536.
- Dettmeyer R.B. (2011) *Forensic Histopathology: Fundamentals and perspectives*. Springer. Berlin, p. 191-209.
- Eming S.A., Koch M., Krieger A., Brachvogel B., Kreft S., Bruckner-Tuderman L., Krieg T., Shannon J.D. and Fox J.W. (2010). "Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds." *J. Proteome Res.* 9, 4758–4766.
- Engelhardt E., Toksoy A., Goebeler M., Debus S., Bröcker E.-B. and Gillitzer R. (1998)

“Chemokines IL-8, GRO α , MCP-1, IP-10, and Mig Are Sequentially and Differentially Expressed During Phase-Specific Infiltration of Leukocyte Subsets in Human Wound Healing.” *Am. J. Pathol.* 153, 1849–1860.

Faucitano L. (2001). “Causes of skin damage to pig carcasses.” *Can. J. Anim. Sci.* 81, 39–45.

Gallant-Behm C.L. and Hart D.A. (2006) “Genetic analysis of skin wound healing and scarring in a porcine model.” *Wound Repair and Regen.* 14, 46–54.

Gilroy D.W., Colville-Nash P.R., Willis D., Chivers J., Paul-Clark M.J. and Willoughby D. (1999) “Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties.” *Nat. Med.* 5, 698–701.

Grossman S.E., Johnston A., Vanezis P. and Perrett D. (2011) “Can we assess the age of bruises? An attempt to develop an objective technique.” *Med. Sci. Law.* 51, 170–176.

Hamdy M.K., Kunkle L.E. and Deatherage F.E. (1957) “Bruised Tissue. II. Determination of the Age of a Bruise.” *J. Anim. Sci.* 16, 490.

Hawkins D. and Abrahamse H. (2007) “How should an increase in alkaline phosphatase activity be interpreted?” *Laser Chem.* 2007, 1-10.

Hughes V.K., Ellis P.S. and Langlois N.E.I. (2004) “The perception of yellow in bruises.” *J. Clin. Forensic Med.* 57, 355-359.

Hughes V.K. and Langlois N.E.I. (2010) “Use of reflectance spectrophotometry and colorimetry in a general linear model for the determination of the age of bruises.” *Forensic Sci. Med. Pathol.* 6, 275–281.

ITP (1996). “Notation des hématomes sur couenne-porc vivant ou carcasse.” *Institute Technique du Porc, Rennes, France.*

Kondo T. and Ishida Y. (2010) “Molecular pathology of wound healing.” *Forensic Sci. Int.* 203, 93–98.

Langlois N.E. (2007) “The science behind the quest to determine the age of bruises-a review of the English language literature.” *Forensic Sci. Med. Pathol.* 3, 241–251.

Li W.-Y., Chong S.S.N., Huang E.Y. and Tuan T.-L. (2003) “Plasminogen activator/plasmin system: A major player in wound healing?” *Wound Repair Regen.* 11, 239–247.

Lin Z.-Q., Kondo T., Ishida Y., Takayasu T. and Mukaida N. (2003) “Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice.” *J. Leuk. Biol.* 73, 713–21.

Livak K.J. and Schmittgen T.D. (2001) “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method.” *Meth.* 25, 402–408.

Madlener M., Parks W.C. and Werner S. (1998) “Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair.” *Exp. Cell Res.* 242, 201–210.

McCausland I.P. and Dougherty R. (1978). “Histological ageing of bruises in lambs and calves.” *Aust. Vet. J.* 54, 525-527.

Mimasaka S., Ohtani M., Kuroda N. and Tsunenari S. (2010) “Evaluating the age of bruises in children spectrophotometric evaluation of the age of bruises in children: Measuring changes in bruise color as an indicator of child physical abuse” *Tohoku J. Exp. Med.* Tohoku J. Exp. Med 220, 171–175.

MLC (1985) “Concern at rindside damage in pigs.” *Meat and marketing tech. Notes no. 4*, Milton Keynes, Meat and Livestock Commission, Bletchley, UK, p. 14-16.

Munro R. and Munro H.M.C. (2013) “Some challenges in forensic veterinary pathology: A review.” *J. Comp. Path.* 149, 57–73.

Ohshima T. and Sato Y. (1998) “Time-dependent expression of interleukin-10 (IL-10) mRNA during the early phase of skin wound healing as a possible indicator of wound vitality.” *Int. J. Legal Med.* 111, 251–255.

- Parikh R., Mathai A., Parikh S., Chandra Sekhar G. and Thomas R. (2008) "Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values." *Indian J. Ophthalmol.* 56, 45–50.
- Psaroudakis K., Tzatzarakis M.N., Tsatsakis A.M. and Michalodimitrakis M.N. (2001) "The application of histochemical methods to the age evaluation of skin wounds: Experimental study in rabbits." *Am. J. Forensic Med. Path.* 22, 341–345.
- Raekallio J. (1972) "Determination of the age of wounds by histochemical and biochemical methods." *Forensic Sci.* 1, 3-16.
- Reynolds L.E., Conti F.J., Silva R., Robinson S.D., Iyer V., Rudling R., Cross B., Nye E., Hart I.R., Dipersio C.M. and Hodivala-Dilke K.M. (2008) "alpha3beta1 integrin-controlled Smad7 regulates reepithelialization during wound healing in mice." *J. Clin. Invest.* 118, 965–74.
- Rocha L.M., Bridi A.M., Mormède P., Weschenfelder A.V., Devillers N., Bertoloni W., Faucitano L. (2013) "Effect of ractophamine administration and castration method on the response to pre-slaughter stress and carcass and meat quality in pigs of two Pietrain genotypes." *J. Anim. Sci.* 91, 3965-3977.
- Rohani M.G. and Parks W.C. (2015) "Matrix remodeling by MMPs during wound repair." *Matrix Biol.* 44–46, 113–121.
- Sato Y., Ohshima T. and Kondo T. (1999) "Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 194–199.
- Stato Y., Ohshima T. (2000) "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.
- Scafide K.R.N. (2012) "Determining the relationship between skin color, sex, and subcutaneous fat and the change in bruise color over time." . PhD Thesis. The John Hopkins Univ. , Baltimore, MD.
- Strappini A.C., Metz J.H.M., Gallo C.B. and Kemp B. (2009) "Origin and assessment of bruises in beef cattle at slaughter." *Animal* 3, 728–736.
- Takamiya M., Fujita S., Saigusa K. and Aoki Y. (2008) "Simultaneous detection of eight cytokines in human dermal wounds with a multiplex bead-based immunoassay for wound age estimation." *Int. J. Legal Med.* 119, 16-21.
- Takamiya M., Saigusa K., Kumagai R., Nakayashiki N. and Aoki Y. (2005) "Studies on mRNA expression of tissue-type plasminogen activator in bruises for wound age estimation". *Int. J. Legal Med.* 122, 143-148.
- Varón-Álvarez L., Romero M. and Sánchez J. (2014) "Caracterización de las contusiones cutáneas e identificación de factores de riesgo durante el manejo presacrificio de cerdos comerciales." *Arc. Med. Vet.* 46, 93–101.
- Vitali M., Conte S., Martelli G., Lessard M. and Faucitano L. (2017) "Which genes are the best indicators for lesion age determination on the pig carcass? A preliminary study. In: Proc. 7th Int. Conf. on the Assessment of Welfare at Farm and Group Level (WAFL), Sept 5-8, Wageningen, The Netherlands.
- Wang J.F., Olson M.E., Reno C.R., Wright J.B. and Hart D.A. (2001) "The pig as a model for excisional skin wound healing: characterization of the molecular and cellular biology, and bacteriology of the healing process." *Comp. Med.* 51, 341–348.
- Wang Y., Yamamoto Y., Kuninaka Y., Kondo T. and Furukawa F. (2015) "Forensic Potential of MMPs and CC Chemokines for Wound Age Determination." *J. Forensic Sci.* 60, 1511–1515.
- Wang L.L., Zhao R., Liu C.S., Liu M., Li S.S., Li J.Y., Jiang S.K., Zhang M., Tian Z.L., Wang M., Zhang M.Z. and Guan D.W. (2016) "A fundamental study on the dynamics of

multiple biomarkers in mouse excisional wounds for wound age estimation.” *J. Forensic Leg. Med.* 39, 138–146.

Wanidworanun C. and Strober W. (1993) “Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis.” *J. Immunol.* (Baltimore, Md. : 1950) 151, 6853–61.

Welfare Quality (2009) “Welfare Quality® Assessment protocol for pigs (sows and piglets, growing and finishing pigs.” Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands. 1–123.

Werner S. and Grose R. (2003) “Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.” *Physiol. Rev.* 83, 835–870.