

Relazione sull'attività svolta per il progetto di ricerca dal titolo: The role of circulating and exosomal miRNAs as biomarkers of drug-resistant epilepsy", LICE ONLUS 2016

Responsabile Dr.ssa Leila Zummo;

Borsista: Dr.ssa Celeste Caruso Bavisotto.

L'attività svolta per il progetto di ricerca in oggetto si inquadra nell'arco temporale che va dal mese di dicembre 2016 al 31 Agosto 2017.

Durante il primo mese è stato stilato un piano di lavoro per il recupero e la selezione dei gruppi di pazienti da analizzare durante lo studio.

I pazienti, tutti affetti da epilessia farmaco-resistente, secondo gli attuali criteri dell' International League against Epilepsy (ILAE) (*Berg AT et al 2010*) , sono stati selezionati secondo le seguenti caratteristiche:

1. pazienti con epilessia focale idiopatica,
2. pazienti con epilessia focale lesionale,
3. pazienti con encefalopatia epilettica (idiopatica e lesionale)

Tutti i casi saranno appaiati per sesso ed età ad i rispettivi controlli sani.

E' stato successivamente predisposto un elenco del materiale di consumo necessario alla raccolta ed alla conservazione del campione e si è provveduto alla richiesta dei preventivi e all'acquisto del materiale stesso (tubi per sierologia, pasteur sterili, criovials, box per criovial); allo stesso tempo si è provveduto al perfezionamento del sistema informatico a supporto della ricerca.

Ulteriore materiale di consumo è stato messo a disposizione dal Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNec) presso cui afferisco.

Al 31 agosto 2017 abbiamo raccolto 20 campioni di sangue di pazienti afferenti all'ambulatorio per la diagnosi e la cura delle epilessie, presso l'UO di Neurologia dell'Università degli Studi di Palermo. 8 di questi campioni sono provenienti da pazienti con epilessia focale idiopatica, 8 da pazienti con encefalopatia epilettica, 2 da pazienti con epilessia focale lesionale e 2 da controlli sani.

Da un punto di vista prettamente scientifico, un'aliquota di questi campioni è stato utilizzato per ottenere il plasma per centrifugazione, e da ciascuno di essi è stato estratto l'RNA totale compreso i piccoli microRNA utilizzando un kit commerciale. L'RNA è stato conservato a -80°C. Inoltre, un'altra aliquota di plasma è stata utilizzata per ottenere gli esosomi attraverso ultracentrifugazioni

differenziali, come riportato nei protocolli messi a punto presso i laboratori del mio Dipartimento di afferenza (*Campanella et al 2015*).

Per validare l'ottenimento delle vescicole e la loro integrità e morfologia, parte degli esosomi estratti sono stati fissati in glutaraldeide al 2,5%, montati su retini di rame e contrastati per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) (*Campanella et al 2015*).

Come si evince dalla **figura 1**, gli esosomi estratti dai campioni di plasma conservano la morfologia tipica delle vescicole extracellulari e presentano una dimensione media di 50 nm.

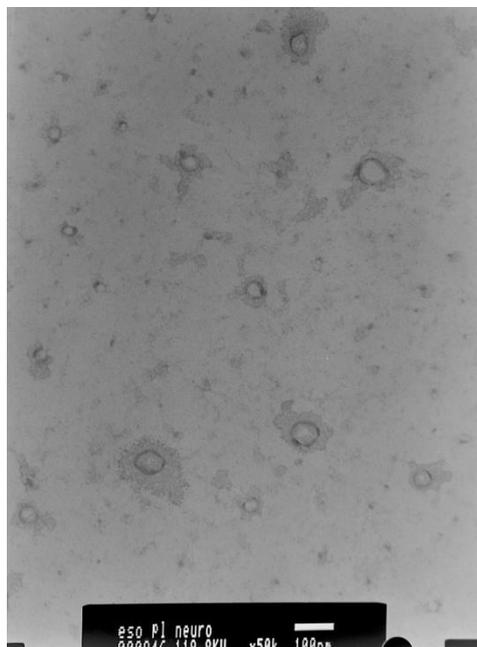


Figura 1. Micrografia elettronica delle vescicole extracellulari isolate dal plasma dei pazienti epilettici. Le vescicole presentano morfologia e dimensioni riconducibili a quelle degli esosomi (20-100 nm).

L'RNA estratto dal plasma è stato quantificato allo spettrofotometro ed è stata effettuata una prima amplificazione utilizzando primer specifici per i seguenti microRNA: miR-8071; miR-663b; miR-146a. In questa prima fase i microRNA selezionati per la loro implicazione nelle tipologie di epilessia in studio, sono stati quantificati tramite real time PCR nella loro forma libera nel sangue.

In **figura 2**, vengono mostrati i risultati di questi primi esperimenti.

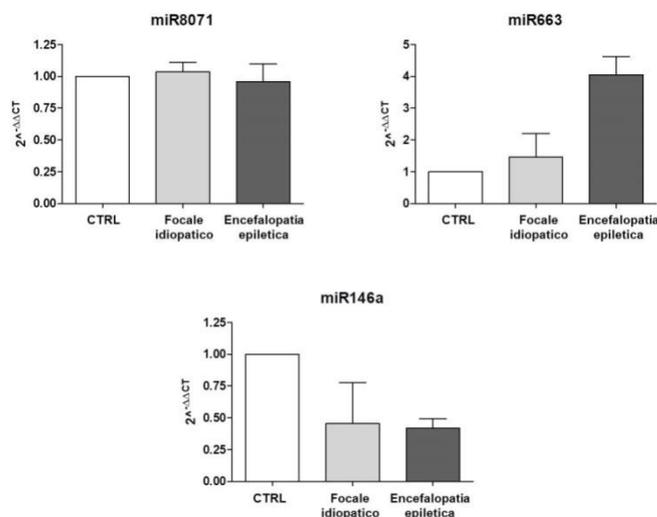


Figura 2. I livelli circolanti di miR8071 sono pressoché comparabili tra i controlli e i pazienti affetti da epilessia focale idiopatica ed encefalopatia epilettica. Mentre si osserva una variazione significativa per miR663 e miR146a. miR146a risulta meno espresso sia nei campioni di pazienti con epilessia focale idiopatica che quelli con encefalopatia epilettica rispetto al controllo; mentre i livelli di miR663 sono maggiori nei campioni provenienti dal plasma dei pazienti affetti da encefalopatia epilettica, rispetto ai rispettivi controlli.

La raccolta di ulteriori campioni è in corso così come la valutazione di altri microRNA sia liberi nel plasma che contenuti all'interno degli esosomi.

Bibliografia

1. Berg AT et al *Epilepsia*. 2010 Apr;51(4):676-85.
2. Campanella C, Rappa F, Sciumè C, Marino Gammazza A, Barone R, Bucchieri F, David S, Curcurù G, Caruso Bavisotto C, Pitruzzella A, Geraci G, Modica G, Farina F, Zummo G, Fais S, Conway de Macario E, Macario AJ, Cappello F. Heat shock protein 60 levels in tissue and circulating exosomes in human large bowel cancer before and after ablative surgery. *Cancer*. 2015 Sep 15;121(18):3230-9. doi: 10.1002/cncr.29499.

Leila Zummo
