

---

**Università degli Studi del Piemonte Orientale  
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca**

**in**

**Medicina Molecolare**

***Ciclo XXIII***

**Relazione 1° anno**

**TITOLO:**

**Deidroepiandrosterone inibisce l'aggregazione  
piastrinica con meccanismo cGMP dipendente**

Candidato: Rastoldo Alessandro

*Tutor:* Prof. Sinigaglia Fabiola

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
1.1 Deidroepiandrosterone	3
1.2 Meccanismi d'azione del DHEA	5
1.3 Trombina	7
<b>2. SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>8</b>
<b>3.MATERIALI E METODI</b>	<b>9</b>
3.1 Materiali	9
3.2 Isolamento delle piastrine	9
3.3 Analisi dell'aggregazione piastrinica	10
3.4 Elettroforesi ed immunoblotting	10
3.5 Saggio cAMP	11
3.6 Saggio cGMP	11
<b>4. RISULTATI</b>	<b>12</b>
4.1 DHEA-S inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina	12
4.2 In vitro la forma attiva del DHEA è quella solfata	15
4.3 DHEA-S inibisce in modo reversibile la fosforilazione trombina dipendente delle proteine marker dell'attivazione piastrinica	16
4.4 DHEA-S induce fosforilazione della proteina VASP con meccanismo cGMP dipendente	17
4.5 I livelli intracellulari di cGMP ma non di cAMP sono aumentati in piastrine trattate con DHEA-S	19
4.6 L'attivazione della guanilato ciclastasi è indipendente dalla produzione di NO	21
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>22</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>24</b>
<b>7. ATTIVITA' FORMATIVA</b>	<b>26</b>

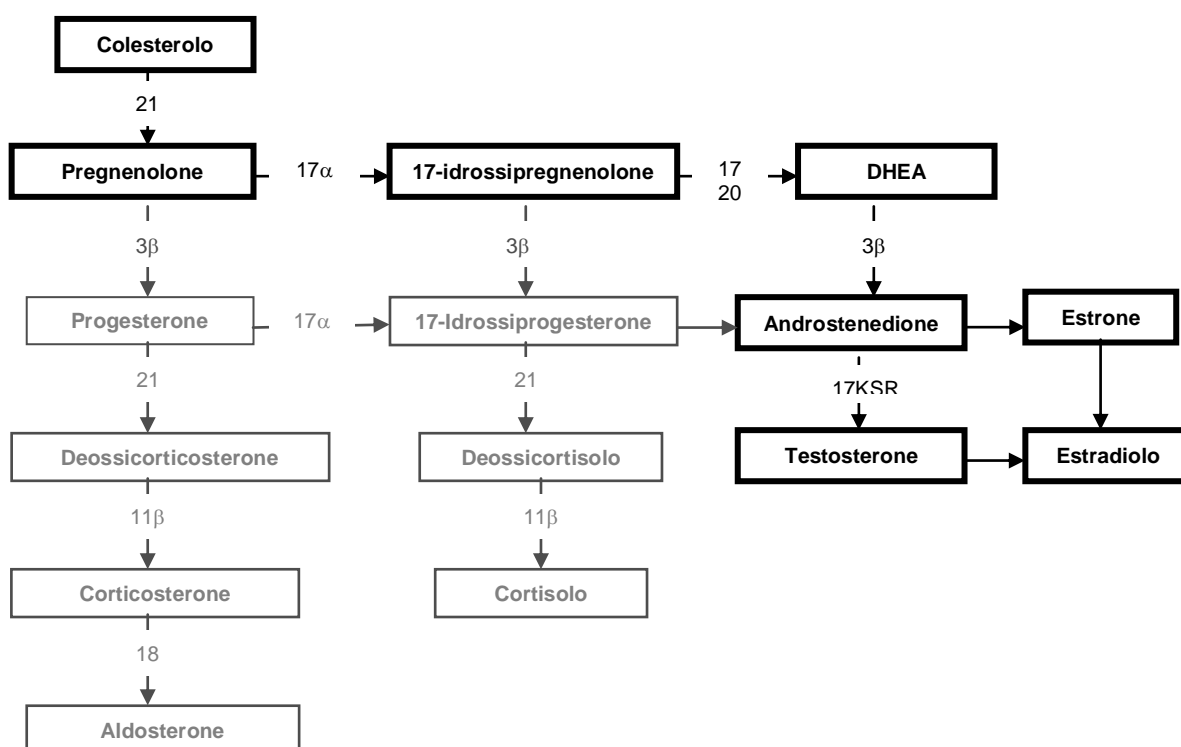
---

**SEZIONE 1**  
**RISULTATI SCIENTIFICI**

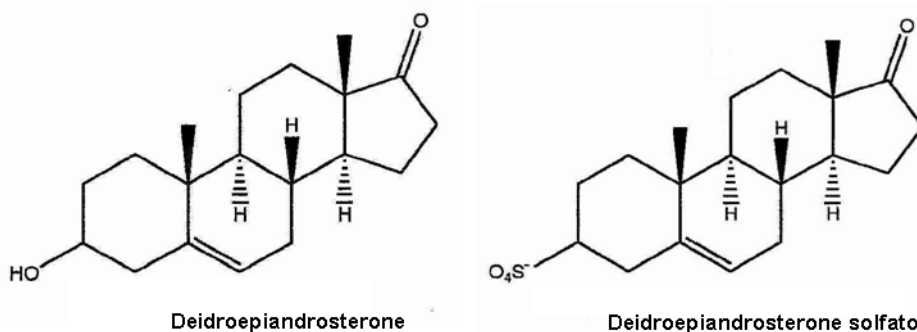
## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1 Deidroepiandrosterone**

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è un ormone steroideo prodotto dalla corteccia surrenale quando stimolata dall'ormone adrenocorticotropo (ACTH) secreto dalla ghiandola ipofisaria (1). Lo stimolo con ACTH promuove nella corteccia la conversione del colesterolo in DHEA, che a sua volta è precursore di ormoni steroidei quali estrogeni e androgeni (2). La sintesi del DHEA si attua in 3 reazioni distinte di cui due citocromo P450-dipendente. Nella prima reazione catalizzata dall'enzima 21-desmolasi il colesterolo viene idrossilato in posizione 21 con formazione di pregnenolone. Successivamente l'enzima  $17\alpha$ -idrossilasi catalizza la seconda reazione di idrossilazione che converte il pregnenolone in  $17\alpha$ -idrossipregnenolone. Infine per azione di una liasi (C17,20 liasi) si forma il DHEA che a sua volta può essere convertito in estrogeno o testosterone. Questa ultima trasformazione è dipendente da diversi fattori che variano da individuo a individuo come ad esempio il sesso e l'età (3).



Nel circolo sanguigno il DHEA è il più abbondante ormone steroideo ed è presente soprattutto nella forma idrosolubile DHEA solfato (DHEA-S). La conversione da DHEA a DHEA-S è catalizzata da una specifica sulfotransferasi (SULT2A1) principalmente nella surrene, ma può avvenire anche nel fegato e nell'intestino (4). La forma solfata rappresenta una riserva per il DHEA, mantiene livelli stabili nell'arco della giornata ed ha emivita più lunga (7-10 ore contro 15-30 minuti del DHEA) per via di una più ridotta eliminazione, mentre la frazione non solfata presenta importanti variazioni giornaliere (5). La concentrazione plasmatica di DHEA-S risulta massima intorno all'età di ventun'anni (3 µg/l), si mantiene costante per circa dieci anni, poi diminuisce più rapidamente dopo i quaranta (1.5-2 µg/l) tanto che ad ottanta il livello non supera il 10 % della concentrazione massima raggiunta a vent'anni (2).



Il DHEA, oltre ad essere un precursore ormonale, è utile nella terapia di malattie autoimmuni (lupus) (6) e inibisce l'attività dell'enzima glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PD) spesso associata ad alcuni processi cancerogenici (2). Inoltre il DHEA:

- stimola la dilatazione delle arterie coronarie successivamente alla sua conversione in estradiolo o in testosterone, due ormoni vasodilatatori, esercitando un'azione cardioprotettiva (5);
- diminuisce l'aggregazione e l'adesione piastrinica alle cellule endoteliali, riducendo in tal modo il rischio dell'insorgenza di placche aterosclerotiche. Azione antiaterogena (5);
- accresce la risposta immunitaria e ottimizza l'effetto dei vaccini potenziando così il sistema immunitario (7);
- può avere un'azione anti-stress (8).

---

Di notevole rilevanza sono gli studi che recentemente hanno dimostrato che il DHEA è anche in grado di contrastare efficacemente problemi legati all'invecchiamento come:

- l'osteoporosi, aumentando la densità minerale ossea (9);
- la formazione di anomalie pigmentarie della pelle aumentando sensibilmente la produzione di sebo (10);
- la degenerazione delle cellule cerebrali migliorando la memoria (11,12).

## **1.2 Meccanismi d'azione del DHEA**

Gli effetti del DHEA sono da tempo noti, ma i suoi meccanismi d'azione sono di difficile interpretazione. Documentata è l'azione del DHEA sui vasi sanguigni: la sua attività è basata sull'attivazione della ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), una famiglia di enzimi che produce ossido nitrico (NO) (13). In cellule endoteliali e cellule derivanti dalla cresta neurale sembra poi che gli effetti siano mediati dal reclutamento di una proteina G accoppiata al recettore (GPCR) (14, 11), escludendo quindi la competizione con gli altri ormoni steroidei (estrogeni e androgeni) per i loro recettori (15). Infine a contatto con cellule del tessuto osseo o della pelle, il DHEA può esercitare la sua azione protettiva legandosi ai recettori degli estrogeni (ER) o degli androgeni (AR) (16,10). Da questa serie di studi è emerso che gli effetti del DHEA potrebbero dipendere dalla presenza di uno specifico recettore che attualmente però non è ancora stato individuato (17).

Il principale meccanismo d'azione del DHEA è basato sull'aumento della sintesi dell'NO (17), molecola segnale gassosa in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana cellulare e agire come potente vasodilatatore, come inibitore della proliferazione nel muscolo liscio e come inibitore dell'adesione e aggregazione piastrinica (13). Viene sintetizzato dalle NOS a partire dall'aminoacido L-arginina nella reazione che porta alla formazione di citrullina (13).

Sono note tre isoforme di ossido nitrico sintasi: NOS1 (NOS neuronale), NOS2 (NOS inducibile) e NOS3 (NOS endoteliale) (18). Generalmente l'attività della NOS3 può essere aumentata attraverso meccanismi trascrizionali, ma considerata la rapidità di risposta sembra più probabile che il DHEA agisca indipendentemente dall'attivazione dell'espressione genica e dalla sintesi proteica (17).

La sintesi di NO porta all'attivazione della guanilato ciclasi solubile (sGC) che produce a partire dal GTP un aumento dei livelli di GMP ciclico (cGMP) implicato poi nell'attivazione

---

della proteina chinasi GMP ciclico dipendente (cGPK o PKG) dalla cui azione dipendono gli effetti biologici dell'ormone (18). La PKG è un dimero costituito da una subunità catalitica (C) e da una subunità regolatoria (19). Quando il GMP ciclico si lega alla subunità R avviene un cambio conformazionale e si ha il rilascio della subunità C che media la fosforilazione di substrati su residui di serina e treonina. Il DHEA, favorendo la sintesi di NO, sarebbe quindi implicato nella stimolazione diretta dell'attività della sGC (13).

Nelle piastrine, contrariamente alle altre linee cellulari, la via del cGMP attiva un segnale di tipo inibitorio. Una seconda via inibitoria nota è quella cAMP dipendente. Perché questa si attivi è necessario che ligandi come adenosina, PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub>, e PGD<sub>2</sub> si leghino ai rispettivi recettori di membrana per stimolare, attraverso la subunità G $\alpha$ s delle proteine G, l'adenilato ciclasi (AC) (20). (Altri ligandi come ADP e adrenalina legandosi ai rispettivi recettori mediano l'inibizione dell'adenilato ciclasi attraverso il legame alla subunità G $\alpha$ i (21)). Sono conosciute 9 isoforme di AC; nelle piastrine quella maggiormente espressa è l'isoforma 7 (22). L'adenilato ciclasi è una proteina strutturale di membrana che catalizza la trasformazione dell'ATP in cAMP la cui funzione è quella di attivare la proteina chinasi cAMP dipendente (cAPK o PKA) (23). Tra i bersagli di PKG e PKA c'è la proteina VASP ("vasodilator-stimulated phosphoprotein") (24).

VASP (46 kDa) è un membro della famiglia delle proteine ricche in prolina ed ha localizzazione citoscheletrica (24). La forma attiva (defosforilata) lega filamenti di actina (F-actina) e profilina, una proteina che forma complessi con la G-actina, svolgendo un ruolo importante nella riorganizzazione del citoscheletro e nella motilità cellulare (eventi implicati nell'attivazione piastrinica) (25). Oltre che nelle piastrine, VASP si trova in un'ampia varietà di tipi cellulari come: fibroblasti, neutrofili, cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule del muscolatura liscia dei vasi (25).

PKA e PKG sono responsabili dell'inattivazione di VASP mediante fosforilazione sulla serina<sup>157</sup>, serina<sup>239</sup> e sulla treonina<sup>278</sup>, ma se la via attivata è GMP ciclico dipendente il sito maggiormente fosforilato è sulla serina<sup>239</sup>, mentre se la via è AMP ciclico dipendente il principale sito coinvolto è sulla serina<sup>157</sup>. Il legame di un gruppo fosfato a questa serina porta ad un apparente cambio di peso molecolare, che passa da 46 kDa a 50 kDa, facilmente apprezzabile in elettroforesi (24, 26).

---

### 1.3 Trombina

La trombina è un forte agonista piastrinico (27). Circola nel plasma sotto forma di zimogeno inattivo (protrombina) che viene convertita in seguito all'azione delle serine proteasi (fattori della coagulazione) attivate lungo la cascata coagulativa mediante taglio proteolitico (27).

La trombina induce l'attivazione e l'aggregazione piastrinica promuovendo il legame del fibrinogeno all'integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ : segnalazione inside-out. Tale legame media a sua volta il segnale outside-in inducendo una serie di eventi intracellulari che portano al rilascio di vescicole di membrana procoagulanti, alla riorganizzazione del citoscheletro ed alla retrazione del coagulo (28).

Questo agonista attiva le piastrine agendo proteoliticamente sui recettori PAR (Protease Activated Receptor) (29). I PAR sono recettori a sette domini transmembrana accoppiati a proteine G eterotrimeriche (27). Quattro sono i recettori fino ad ora identificati, ma sulle piastrine umane sono presenti solo PAR-1 e PAR-4 che possiedono una diversa affinità per la trombina: PAR-4 richiede per la sua attivazione concentrazioni di agonista molto più alte rispetto a PAR-1 (27). La trombina taglia una porzione di circa 40 aminoacidi all'estremità NH<sub>2</sub>-terminale dei recettori PAR esponendo una nuova sequenza NH<sub>2</sub>-terminale in grado di legarsi al corpo del recettore, che va così incontro ad un cambio conformazionale che attiva la proteina G associata (30). L'azione della trombina determina infine reazioni di rilascio del contenuto dei granuli, produzione di trombossano A<sub>2</sub>, riorganizzazione del citoscheletro ed aggregazione irreversibile (30). Lo spegnimento del segnale avviene attraverso un fenomeno di desensitizzazione dei recettori che li rende refrattari ad una successiva stimolazione: vengono infatti fosforilati su residui di serina e treonina nella loro porzione citoplasmatica che ne segnala la rimozione dalla membrana o pur restando in membrana risultano insensibili ad una successiva stimolazione (31 e 32).

La trombina possiede anche un altro recettore cioè la subunità GPIb $\alpha$  del complesso glicoproteico GPIb-IX-V, a cui si lega senza avere su di essa alcuna azione proteolitica. Tale interazione avrebbe la funzione di posizionare correttamente l'enzima favorendo l'azione proteolitica su PAR-1 (29).

---

## 2. SCOPO DEL LAVORO

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è un ormone steroideo ed è il precursore di estrogeni e androgeni (2). Nel circolo sanguigno il DHEA è l'ormone steroideo più abbondante ed è presente soprattutto nella forma idrosolubile DHEA solfato (DHEA-S). La forma solfata rappresenta una riserva per il DHEA, mantiene livelli stabili nell'arco della giornata ed ha un'emivita più lunga per via di una ridotta eliminazione, mentre la frazione non solfata presenta importanti variazioni giornaliere (5). La concentrazione plasmatica di DHEA-S risulta massima intorno all'età di ventun'anni (3 µg/l), si mantiene costante per circa dieci anni, poi diminuisce più rapidamente dopo i quaranta (2). Sono da tempo noti i suoi effetti utili nella terapia delle malattie autoimmuni (6); le sue azioni cardioprotettive e anti-aterogeniche (5) diminuendo l'aggregazione e l'adesione piastrinica alle cellule endoteliali.

In questo lavoro ci siamo proposti di investigare e caratterizzare l'effetto del DHEA-S sulla funzionalità piastrinica ed in particolare sul segnale di trasduzione coinvolto. Dagli studi *in vitro* effettuati possiamo affermare che il DHEA-S è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta da un agonista forte come la trombina e che questo effetto è accompagnato dalla rapida fosforilazione inibitoria della proteina VASP, coinvolta nel meccanismo cGMP dipendente.



---

## 3.MATERIALI E METODI

### 3.1 Materiali

Sodio Nitroprussiato (SNP) acquistato dalla **Alexis Biochemicals** (Lausen, Switzerland).

I kit cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA), cGMP[H<sup>3</sup>] Radioimmunoassay (RIA) acquistati dalla **Amersham Biosciences** (Uppsala, Sweden).

Gli anticorpi policlonali anti-p44/42 MAP chinasi e anti-fosfo-p44/42 MAP chinasi (Thr202/Tyr204), entrambi anti-coniglio e anti-Akt sono stati acquistati dalla **Cell Signaling Technology** (Beverly, MA). L'anticorpo policlonale anti-VASP anti-coniglio e l'anticorpo monoclonale anti-VASP-Pser239 anti-topo sono stati entrambi forniti dalla **Calbiochem** (San Diego, CA). L'anticorpo monoclonale anti-Akt/PKB (pS<sup>473</sup>) fornito dalla **BioSource** (Camarillo, CA).

Inibitori delle ossido nitrico sintasi, N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-arginine (L-NMMA) e N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine (L-NAME) acquistato dalla **Calbiochem** (San Diego, CA).

Trombina, Deidroepiandrosterone 3-solfato, estrone solfamato (EMATE, inibitore delle solfatasi) e forskolina forniti dalla **Sigma-Aldrich** (St Louis, MO).

### Metodi

### 3.2 Isolamento delle piastrine

I campioni di sangue provengono da donatori volontari che non abbiano assunto farmaci nei dieci giorni precedenti alla donazione. Il prelievo si effettua in presenza di ACD (130 mM acido citrico, 152 mM Na-citrato, 112 mM D-glucosio) nella proporzione di una parte ogni nove di sangue. I campioni aliquotati sono centrifugati a 120 x g per 10 minuti a temperatura ambiente in modo da separare il plasma ricco in piastrine (PRP) da globuli rossi e bianchi. Il PRP è quindi raccolto e centrifugato a 300 x g per 10 minuti a temperatura ambiente per separare il plasma povero in piastrine (PPP), che viene eliminato, dal pellet piastrinico che viene risospeso in gocce di ACD. Le piastrine vengono poi purificate mediante gel filtrazione su colonna di Sepharose 2B lavata in Tyrode a pH 7,4 (10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>). Le piastrine ottenute vengono quindi contaminate al microscopio ottico su camera di Burkner e portate alla concentrazione desiderata in Tyrode.

---

### 3.3 Analisi dell'aggregazione piastrinica

L'aggregazione piastrinica viene seguita utilizzando un aggregometro Chrono Log modello 560CA. Lo strumento registra le variazioni dell'assorbanza ottenuta dal passaggio di un fascio luminoso attraverso la sospensione piastrinica.

Le piastrine portate alla concentrazione di  $3 \times 10^8$ /ml sono addizionate di glucosio (5.5 mM),  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) e  $\text{MgCl}_2$  (2 mM) e lasciate riposare 30 minuti a temperatura ambiente prima di iniziare l'esperimento. Campioni da 400  $\mu\text{l}$  vengono preincubati per 1 minuto con DHEA-S (0.3-0.15-0.075 mM) a 37° C sotto costante agitazione magnetica e poi stimolati con concentrazioni crescenti di trombina (0.02-0.05-0.1 U/ml). L'aggregazione viene monitorata per almeno 5 minuti. Negli esperimenti in cui sono stati usati gli inibitori (10  $\mu\text{M}$ ) EMATE, (1 mM) L-NMMA e (1 mM) L-NAME, le piastrine sono state incubate rispettivamente per 20 e 30 minuti prima dello stimolo con DHEA-S.

### 3.4 Elettroforesi ed immunoblotting

Piastrine gel-filtrate sono portate alla concentrazione di  $1 \times 10^9$ /ml, addizionate di glucosio (5.5 mM) e lasciate riposare per 30 minuti a temperatura ambiente.

Campioni da 100  $\mu\text{l}$  vengono preincubati per 1 minuto a 37° C con 0.3-0.15-0.075 mM DHEA-S o con 0.3 mM DHEA-S da 10 secondi a 5 minuti e stimolati con 0.05 U/ml trombina per 1 minuto. Le cellule vengono lisate in ghiaccio con Laemly Buffer (6 % SDS, 1.5 % DTT, 30 % glicerolo, 0.03 % blu di bromofenolo) addizionato di inibitori (1 mM inibitori di proteasi, 3 mM glicerolo fosfato, 20 mM sodio pirofosfato, 1 mM ortovanadato, 10 mM sodio fluoruro, 1 mM EGTA). I campioni sono separati con SDS-PAGE su gel di poliacrilammide (10 %), trasferite su membrana PVDF e analizzati mediante immunoblotting utilizzando anticorpi anti-ERK1/2, anti-pERK, anti-Akt, anti-pAkt, anti-VASP-Pser239 e anti-VASP.

---

### **3.5 Saggio cAMP**

Piastrine gel-filtrate sono portate alla concentrazione di  $1 \times 10^8$ /ml e addizionate di 0.5 % BSA e 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Campioni da 200  $\mu\text{l}$  sono posti a 37° C, incubati con 0.3 mM DHEA-S per 1 minuto o con 10  $\mu\text{M}$  Forskolina (come controllo positivo) e lisati dopo l'aggiunta di 400  $\mu\text{l}$  di Etanolo assoluto 96 % ghiacciato. Dopo averli tenuti per 5 minuti in ghiaccio vengono centrifugati a 15500 x g per 10 minuti a 4° C per separare il precipitato dal surnatante che viene raccolto. I pellet vengono lavati con Etanolo 96 % ghiacciato, agitati su vortex e ancora centrifugati a 15500 x g per 10 minuti a 4° C. I surnatanti derivanti sono poi aggiunti ad ognuno dei precedenti e portati a secco a 45° C con l'evaporatore. I campioni liofilizzati sono utilizzati nel saggio dell'AMP ciclico, condotto utilizzando il kit cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System (Amersham), seguendo il protocollo acetilante.

### **3.6 Saggio cGMP**

Piastrine gel-filtrate sono portate alla concentrazione di  $1 \times 10^9$ /ml e addizionate di 0.5 % BSA e 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Campioni da 200  $\mu\text{l}$  sono posti a 37° C, incubati con 0.3 mM DHEA-S per 1 minuto o con 10  $\mu\text{M}$  SNP (come controllo positivo) e lisati dopo l'aggiunta di 400  $\mu\text{l}$  di Etanolo assoluto 96 % ghiacciato. Si procede con il protocollo sperimentale sopra descritto (paragrafo 3.5).

I campioni liofilizzati sono poi analizzati usando il kit cGMP[ $\text{H}^3$ ] Radioimmunoassay (RIA) System (Amersham).

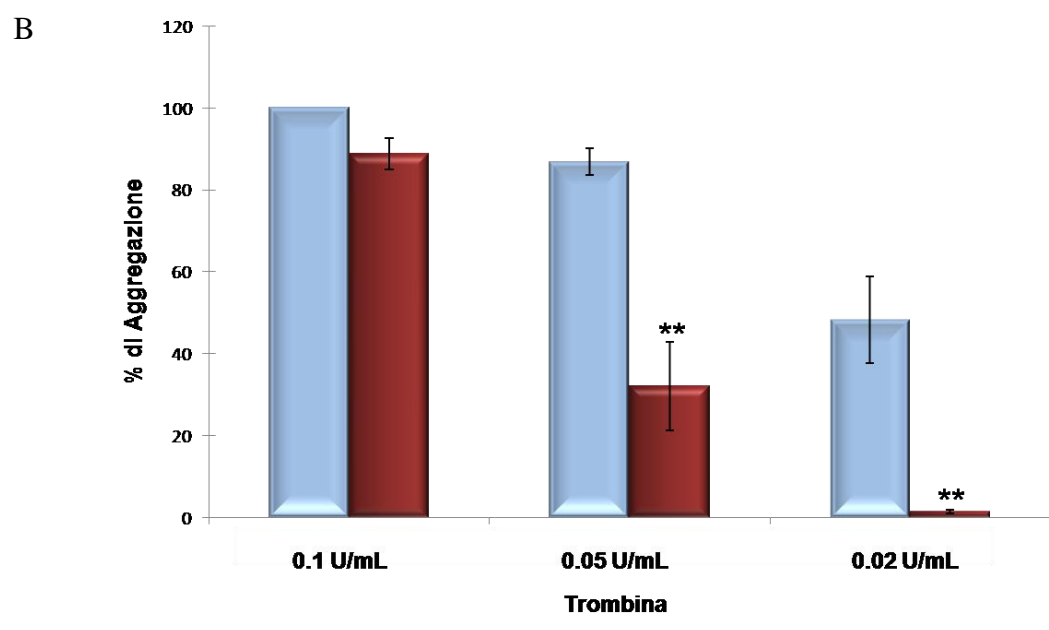
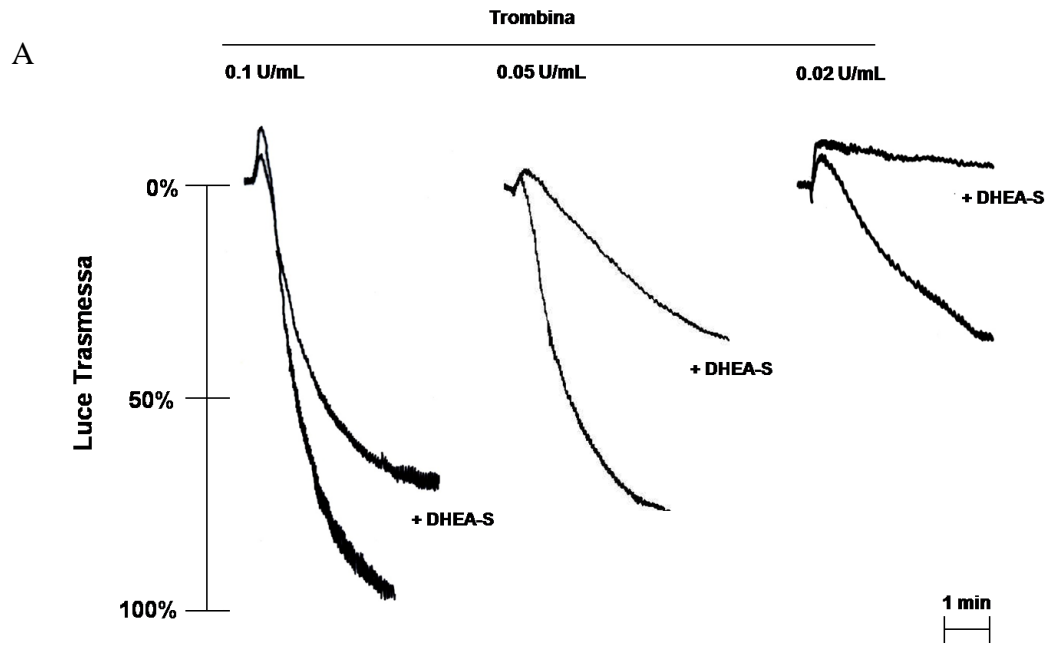
---

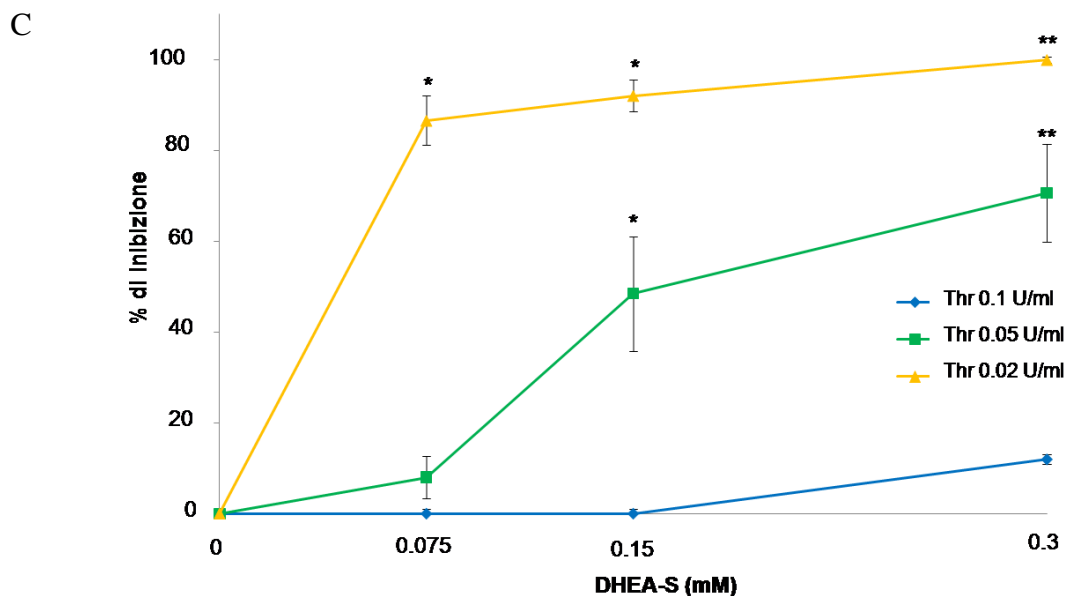
## 4. RISULTATI

### 4.1 DHEA-S inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina

Il primo obiettivo di questo lavoro è stato studiare gli effetti del DHEA-S sull'aggregazione piastrinica indotta da un agonista forte come la trombina. Piastrine preparate mediante gel-filtrazione sono state pre-incubate con tampone o con (0.075-0.15-0.3 mM) DHEA-S (la molecola desolforata non risulta sufficientemente solubile per essere utilizzata direttamente) per 1 minuto a 37° C e poi stimulate con dosi crescenti di trombina (0.02 U/ml, 0.05 U/ml e 0.1 U/ml). In figura 1A è riportato un tracciato di aggregazione relativo ad un esperimento rappresentativo di tre condotti con lo scopo di identificare la percentuale di aggregazione dipendente da trombina in campioni pre-incubati con 0.3 mM DHEA-S. Dagli esperimenti effettuati è evidente come questa concentrazione di DHEA-S possa causare riduzione dell'aggregazione piastrinica dipendente dalla concentrazione di agonista usata. Abbiamo dimostrato che il trattamento con questa concentrazione di DHEA-S è in grado di bloccare completamente l'aggregazione indotta da dosi considerate “basse” di agonista (trombina 0.02 U/ml) e che lo stesso trattamento con DHEA-S causa una riduzione dell'aggregazione del 50% e del 10%, rispettivamente per trombina 0.05 e 0.1 U/ml (fig. 1B).

Inoltre per meglio valutare l'efficacia del DHEA-S come inibitore della risposta piastrinica alla trombina, campioni di piastrine gel-filtrate sono state pre-incubate per 1 minuto a 37° C con tampone o con dosi crescenti di DHEA-S (0.075-0.15-0.3 mM) e poi stimulate con diverse concentrazioni di trombina (0.02 U/ml, 0.05 U/ml e 0.1 U/ml) (fig. 1C). Il DHEA-S inibisce con meccanismo dose dipendente l'aggregazione piastrinica data da 0.02 e 0.05 U/ml trombina, mentre in piastrine stimulate con 0.1 U/ml trombina determina una modesta diminuzione dell'aggregazione solo alla concentrazione più alta (0.3 mM).

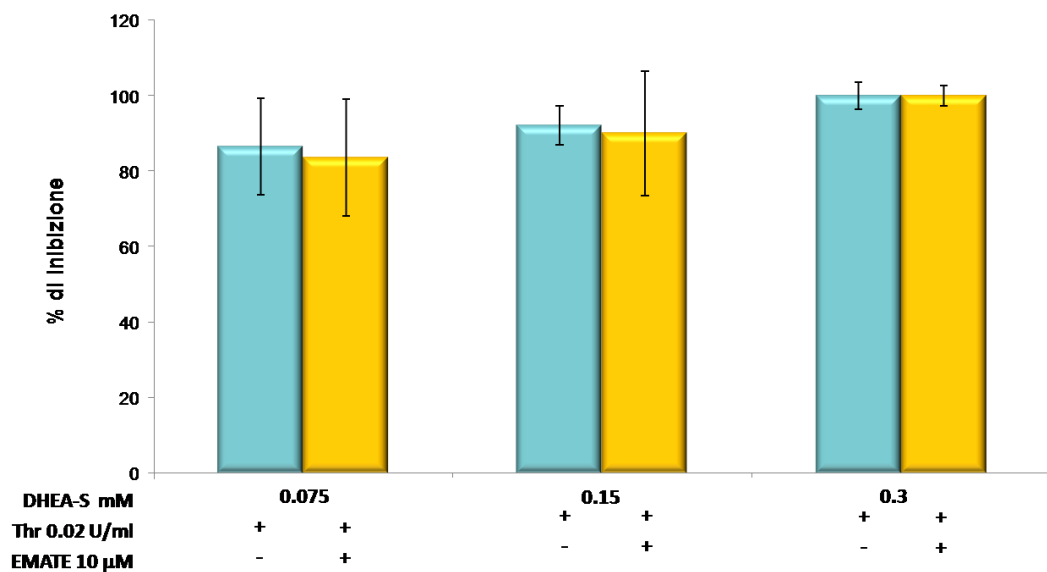




**Figura 1. Il DHEA-S riduce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina.** **A)** Campioni di piastrine gel filtrate concentrate  $3 \times 10^8$ /ml sono pre-incubati con tampone o con 0.3 mM DHEA-S per 1 minuto a  $37^\circ$  C e stimolati con 0.02 U/ml, 0.05 U/ml e 0.1 U/ml trombina. In figura sono riportate le tracce di aggregazione ottenute in uno dei tre identici esperimenti eseguiti su piastrine isolate da diversi donatori. **B)** Analisi statistica dei risultati ottenuti negli esperimenti di aggregazione piastrinica indotta da diverse dosi di trombina in assenza ed in presenza di 0.3 mM DHEA-S. I risultati sono stati normalizzati ponendo uguale a 100 il valor medio di aggregazione misurato stimolando le piastrine con 0.1 U/ml trombina in assenza di DHEA-S. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ). **C)** Piastrine gel-filtrate sono state pre-incubate con il tampone o con concentrazioni crescenti di 0.075 mM, 0.15 mM e 0.3 mM DHEA-S per 1 minuto e poi stimolate con dosi crescenti di trombina (0.02 U/ml, 0.05 U/ml e 0.1 mM). I risultati sono espressi come percentuale di inibizione calcolata rispetto al valore di aggregazione massimo misurato stimolando le cellule in assenza di DHEA-S. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ).

## 4.2 In vitro la forma attiva del DHEA è quella solfata

Per poter definire quale forma di DHEA (solfata o non) agisca direttamente sulle piastrine *in vitro*, campioni di piastrine preparate mediante gel-filtrazione sono stati pre-incubati per 30 minuti a 37° C con 10 µM estrone solfamato (EMATE, inibitore delle solfatasi), successivamente incubati con tampone o con differenti dosi (0.075-0.15-0.3 mM) di DHEA-S per 1 minuto a 37° C e poi stimolate con 0.02 U/ml trombina. In figura 2 è riportata la percentuale di inibizione relativa a campioni stimolati con DHEA-S o con l'aggiunta di EMATE. Il trattamento con l'inibitore delle solfatasi non è sufficiente a modificare l'inibizione indotta con DHEA-S, possiamo concludere che la forma attiva di DHEA è quella solfata.



**Figura 2. EMATE non modifica gli effetti del DHEA-S.** Campioni di piastrine gel-filtrate sono pre-incubate con 10 µM EMATE per 30 min a 37° C, incubate con concentrazioni crescenti di DHEA-S (0.075-0.15-0.3 mM) per 1 min e poi stimolate con 0.02 U/ml trombina.

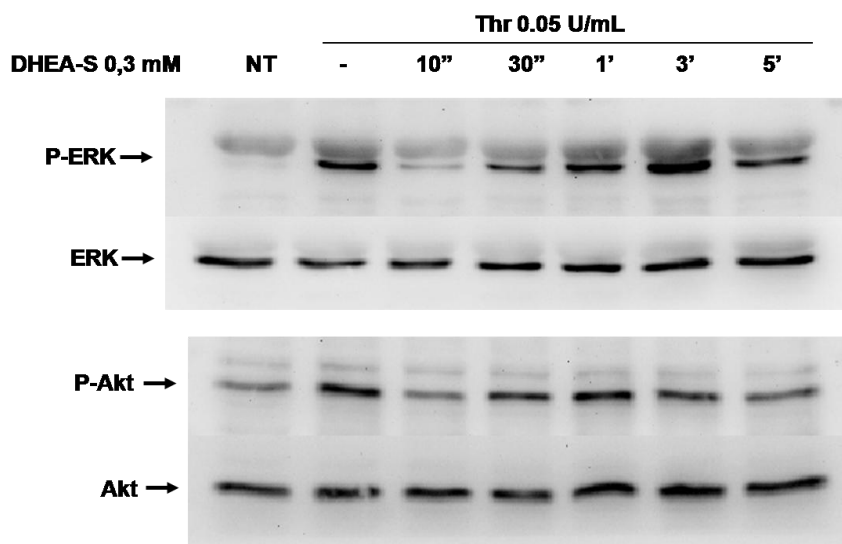
### 4.3 DHEA-S inibisce in modo reversibile la fosforilazione trombina dipendente delle proteine marker dell'attivazione piastrinica

In letteratura è stato dimostrato che in piastrine umane la trombina causa fosforilazione di diverse proteine, come Akt e MAP chinasi ERK  $\frac{1}{2}$ , responsabili dell'attivazione piastrinica (33 e 34).

Per valutare l'effetto del DHEA-S su questi eventi, piastrine gel-filtrate sono state pre-incubate a 37° C con tampone o con 0.3 mM DHEA-S per tempi da 10 secondi a 5 minuti, successivamente stimulate con 0.05 U/ml trombina per 1 ulteriore minuto a 37° C, lisate e analizzate in immunoblotting con gli specifici anticorpi.

Abbiamo così potuto dimostrare che la fosforilazione trombina dipendente di entrambe le chinasi Akt e ERK  $\frac{1}{2}$  è pesantemente inibita solo in piastrine pretrattate con DHEA-S per 10 secondi (fig. 3). In piastrine pre-incubate per più lunghi periodi di tempo l'inibizione della fosforilazione trombina dipendente è progressivamente diminuita e, per tempi di 1 minuto o maggiori, torna ad essere paragonabile a quella indotta da trombina in assenza di DHEA-S.

Si può quindi concludere che il DHEA-S è in grado di inibire la fosforilazione di Akt e ERK indotta da trombina con effetto rapido e reversibile.



**Figura 3. Inibizione della fosforilazione di ERK e Akt tempo dipendente.** Campioni di piastrine gel-filtrate concentrati  $1 \times 10^9$ /ml sono stati pre-incubati con 0.3 mM DHEA-S per tempi crescenti da 10 secondi a 5 minuti e successivamente stimolati con 0.05 U/ml di trombina per 1 minuto a 37° C. Aliquote di ogni campione sono analizzate in immunoblotting utilizzando anticorpi anti-pERK, anti-ERK, anti-pAkt e anti-Akt. In figura è riportato un esperimento significativo di 3 condotti su piastrine di diversi donatori.



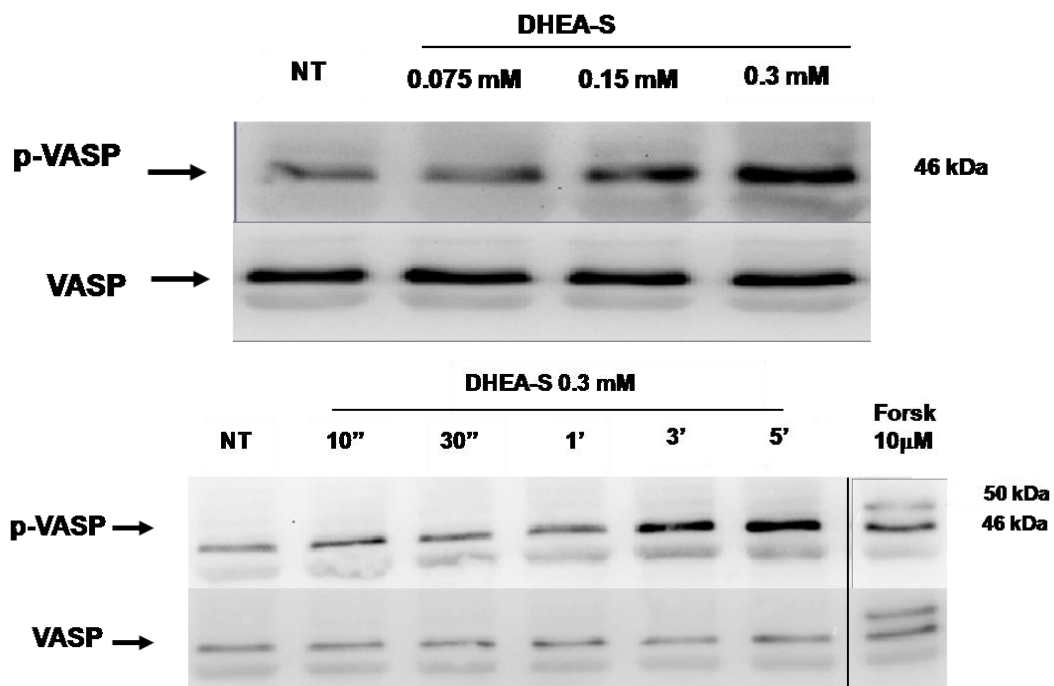
---

#### **4.4 DHEA-S induce fosforilazione della proteina VASP con meccanismo cGMP dipendente**

In letteratura è riportato che l'inibizione delle piastrine circolanti, così come la loro attivazione, richiede la fosforilazione di specifiche proteine. Tra queste vi è VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) una proteina citoscheletrica attiva in forma defosforilata, in grado di legare filamenti di actina e profilina svolgendo un ruolo importante nella riorganizzazione del citoscheletro e nella motilità cellulare, mentre inattiva in forma fosforilata (in serina<sup>157</sup> e serina<sup>239</sup>) dissociata dalle componenti citoscheletriche (25).

L'inibizione delle piastrine umane è generalmente legata all'aumento dei nucleotidi ciclici AMP e/o GMP che portano all'attivazione di proteine chinasi PKA e PKG che catalizzano le reazioni di fosforilazione su residui di serina/treonina, eventi che portano ad inibizione piastrinica. VASP è un substrato di PKA e PKG e viene fosforilato principalmente su serina 157 e serina 239, rispettivamente. A seguito della fosforilazione cAMP dipendente sulla serina 157 VASP subisce un apparente cambio di peso molecolare, che passa da 46 kDa a 50 kDa, facilmente apprezzabile in elettroforesi (24, 26).

Per investigare la possibilità che l'effetto inibitorio del DHEA-S sull'aggregazione piastrinica coinvolga la fosforilazione di VASP, piastrine gel-filtrate sono incubate per tempi crescenti da 10 secondi a 5 minuti a 37° C con il tampone (NT) o con concentrazioni di DHEA-S da 0.075 mM a 0.3 mM. I lisati ottenuti sono stati analizzati in immunoblotting con anticorpi anti-VASP e anti-p-VASP, specifici per la serina 239 e 157. Abbiamo così potuto confermare che il DHEA-S promuove una robusta fosforilazione della proteina VASP con meccanismo dose e tempo dipendente (fig. 4A e 4B). Inoltre, il DHEA-S non modifica la mobilità elettroforetica di VASP, si può così dedurre che VASP venga fosforilata sulla serina 239, che è substrato preferenziale per PKG ma non per PKA.



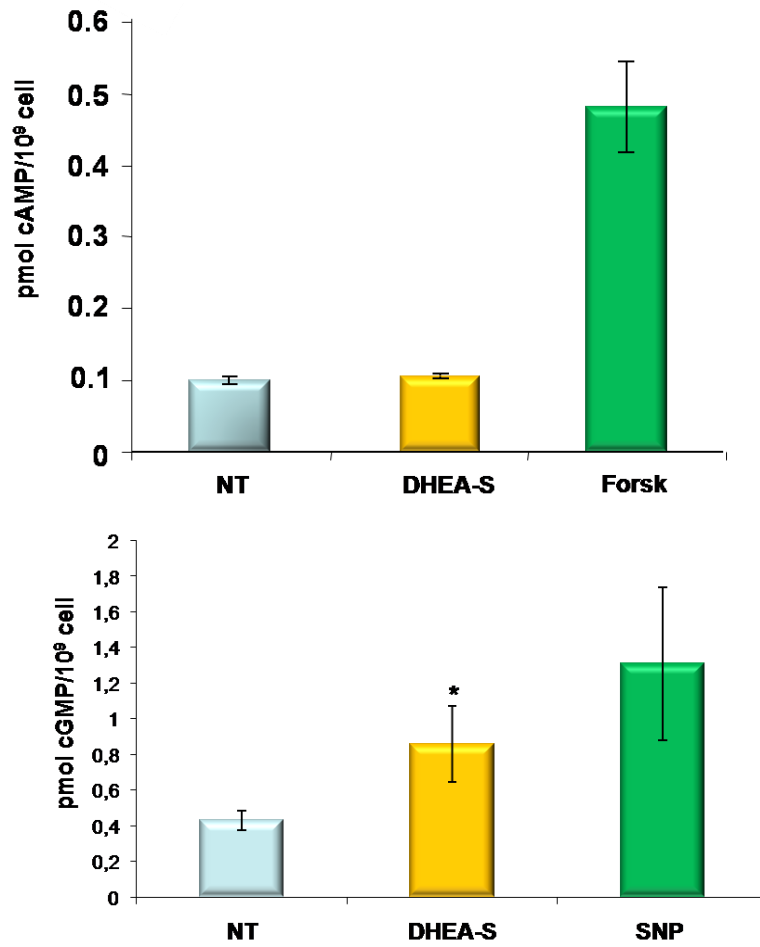
**Figura 4. Fosforilazione di VASP dose e tempo dipendente.** Piastrine gel-filtrate concentrate  $1 \times 10^9$ /ml sono state stimulate con tampone (NT) o con concentrazioni crescenti di DHEA-S da 0.075 mM a 0.3 mM per 1 minuto a  $37^\circ$  C (A), o stimolati con 0.3 mM DHEA-S per tempi crescenti da 10 secondi a 5 minuti (B). In corrispondenza del controllo positivo con forskolina si possono identificare 2 bande a 46 kDa e a 50 kDa caratteristiche della fosforilazione in serina<sup>157</sup>. Per valutare fosforilazione e l'andamento della proteina totale, una frazione di ogni campione è stata analizzata in immunoblotting utilizzando anticorpi anti-VASP P<sub>Ser239</sub> e anti-VASP. I risultati mostrati in figura sono stati ottenuti in uno dei tre identici esperimenti condotti su piastrine di diversi donatori.

---

#### **4.5 I livelli intracellulari di cGMP ma non di cAMP sono aumentati in piastrine trattate con DHEA-S**

Per meglio definire il segnale di trasduzione attraverso cui il DHEA-S promuove la fosforilazione di VASP in piastrine umane, abbiamo considerato i livelli di cAMP e cGMP in cellule trattate con tampone (NT) o con 0.3 mM DHEA-S per 1 minuto a 37° C e con 10 µM forskolina o 10 µM sodio nitroprussiato (SNP) come rispettivi controlli positivi.

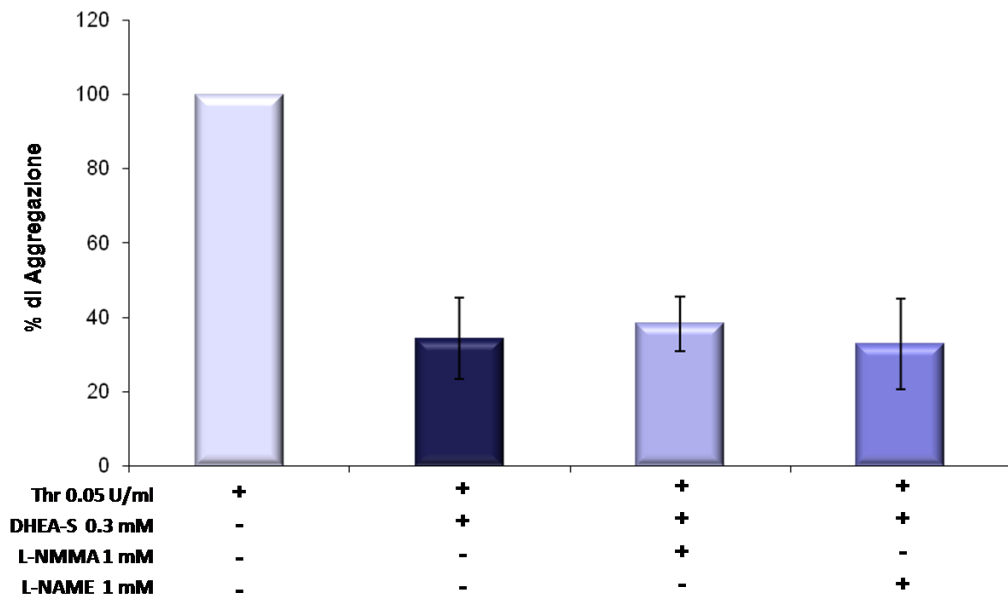
Piastrine gel-filtrate trattate con DHEA-S non mostrano variazioni rilevabili nel contenuto di cAMP rispetto al livello basale (fig. 5A); mostrano invece un significativo aumento dei livelli di cGMP quando confrontate con piastrine non attivate (fig. 5B). Questo dato è concordante con il tipo di fosforilazione (sulla serina 239) indotta su VASP dal DHEA-S (fig. 4A e B). Possiamo così concludere che il DHEA-S causa attivazione della chinasi cGMP dipendente, che porta alla fosforilazione di VASP sulla serina 239 e guida l'inibizione piastrinica.



**Figura 5. Il DHEA-S aumenta i livelli di cGMP ma non i livelli di cAMP.** I grafici rappresentano le concentrazioni medie di cAMP (A) e cGMP (B) con i relativi errori standard rilevati ai 3 esperimenti indipendenti effettuati mediante il kit cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay System e cGMP[H<sup>3</sup>] Radioimmunoassay. Le piastrine sono state stimolate con il tampone (NT), con 0.3 mM DHEA-S, con 10  $\mu$ M forskolina e 10  $\mu$ M SNP a 37° C.

## 4.6 L'attivazione della guanilato ciclastasi è indipendente dalla produzione di NO

Per capire se l'aumento dei livelli di cGMP dipende dalla produzione di NO abbiamo utilizzato L-NMMA e L-NAME, inibitori competitivi delle NO-sintasi (NOS). Campioni di piastrine gel-filtrate, alla concentrazione di  $3 \times 10^8$ /ml, sono state pre-incubate per 20 minuti con 1 mM L-NMMA e 1 mM L-NAME, trattate con 0.3 mM DHEA-S o con il solo tampone per 1 minuto e successivamente stimulate con 0.05 U/ml trombina a 37° C. Come già precedentemente riportato il DHEA-S (0.3 mM) è in grado di ridurre notevolmente l'aggregazione indotta da 0.05 U/ml trombina (figura 1). Il pretrattamento dei campioni con gli inibitori L-NMMA o L-NAME non modifica l'effetto del DHEA-S sull'aggregazione piastrinica indotta da trombina (figura 6). Per concludere, il pre-trattamento con DHEA-S provoca una significativa inibizione dell'aggregazione trombina dipendente; tale inibizione non è modificata dagli inibitori delle NOS (L-NMMA e L-NAME). Questo risultato sembra escludere che il DHEA-S agisca attivando le NOS.



**Figura 6. Gli inibitori delle NOS non modificano l'effetto del DHEA-S.** Piastrine gel-filtrate concentrate  $3 \times 10^8$ /ml sono pre-incubate con 1 mM L-NMMA o con 1 mM L-NAME per 20 minuti, trattate con 0.3 mM DHEA-S per 1 minuto e stimulate con 0.05 U/ml trombina a 37° C. Nel grafico sono riportate le percentuali di aggregazione e gli errori standard relativi a 3 esperimenti indipendenti. I risultati sono stati normalizzati ponendo uguale a 100 il valor medio di aggregazione misurato stimolando le piastrine con 0.05 U/ml trombina in assenza di DHEA-S.

---

## 5. DISCUSSIONE

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è il più abbondante ormone steroideo presente nel circolo sanguigno, viene secreto dalla ghiandola surrenale a partire dalla pubertà e viene convertito in estrogeni e testosterone. La sua concentrazione diminuisce con il trascorrere del tempo a partire dai trent'anni e viene associata ad un aumento della suscettibilità verso malattie tipiche dell'età avanzata. E' noto inoltre un suo ruolo protettivo nei confronti di malattie aterosclerotiche, cardioprotettive e autoimmuni.

In letteratura è riportato inoltre che il DHEA-S è in grado di portare ad inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta da acido arachidonico (2) attraverso meccanismi ancora sconosciuti. Tra le due forme in cui il deidroepiandrosterone si trova nel circolo sanguigno, nei nostri esperimenti è stata utilizzata la forma solfata, DHEA-S, perchè la molecola desolforata non è risultata sufficientemente solubile per i nostri scopi.

Per prima cosa ci siamo occupati di valutare gli effetti del DHEA-S sull'aggregazione indotta da trombina, un forte agonista piastrinico. Da questo studio è emerso che il DHEA-S è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta da trombina in modo dose-dipendente. La concentrazione più alta utilizzata di DHEA-S (0.3 mM) infatti inibisce completamente l'aggregazione dipendente da trombina 0.02 U/ml. Nei confronti dell'aggregazione indotta da trombina 0.05 U/ml abbiamo ottenuto una riduzione significativa di circa il 50 %, mentre per la concentrazione più alta di agonista (trombina 0.1 U/ml) abbiamo rilevato una riduzione pari al 10 % di aggregazione (figura 1). Abbiamo inoltre verificato che la minore concentrazione di DHEA-S efficace sulla trombina 0.02 U/ml è pari a 0.075 mM. Per verificare che effetti riportati fossero dipendenti da DHEA-S e non da DHEA, derivante dalla desolfurazione dell'ormone, abbiamo utilizzato un inibitore delle solfatasi (figura 2). In questo modo ci è stato possibile stabilire che gli effetti riscontrati sono attribuibili realmente al DHEA-S.

Parallelamente agli studi di aggregazione abbiamo anche valutato mediante immunoblotting i livelli di fosforilazione delle proteine Akt e ERK 1/2, marker riconosciuti di attivazione piastrinica (figura 3). Per tempi brevi di pre-trattamento con DHEA-S abbiamo rilevato una evidente riduzione della fosforilazione di ERK trombina-dipendente. Per tempi più lunghi, superiori a 1 minuto invece il segnale è risultato del tutto paragonabile a quello indotto dalla sola trombina suggerendo che l'azione del DHEA-S si realizzi in tempi brevissimi.

Per correlare l'azione del DHEA con altri eventi di tipo inibitorio abbiamo indagato la fosforilazione della proteina VASP. Questa proteina citoscheletrica durante l'attivazione

---

piastrinica si trova in stato defosforilato e media la riorganizzazione del citoscheletro, mentre in forma fosforilata (in serina<sup>157</sup> e serina<sup>239</sup>) risulta inattiva e si dissocia dalle componenti citoscheletriche. Dai dati ottenuti in figura 4 possiamo affermare che l'azione inibitoria del DHEA-S induce fosforilazione di VASP in modo tempo e dose dipendente.

Questa fosforilazione può dipendere dall'attivazione, via AMP ciclico o GMP ciclico, di chinasi quali PKA e PKG. Per verificare la capacità del DHEA-S di attivare una delle due vie, abbiamo dosato il contenuto in cAMP e cGMP di piastrine pre-incubate con DHEA-S. Dai dati ottenuti possiamo concludere che, a differenza del cAMP (figura 5A), i livelli di cGMP aumentano in modo significativo (figura 5B). Possiamo quindi affermare che il meccanismo d'azione del DHEA-S passa attraverso l'attivazione della via del cGMP. In letteratura è riportato che il DHEA-S è in grado di aumentare i livelli di NO in cellule endoteliali (17). Tale effetto può derivare ad esempio dall'aumento di attività dell'enzima ossido nitrico sintasi che catalizza la reazione in cui l'arginina viene trasformata in citrullina con rilascio di NO. Per dimostrare quest'ipotesi abbiamo utilizzato degli inibitori delle NOS (L-NMMA e L-NAME) in grado di bloccare l'enzima. In base all'ipotesi fatta ci aspettavamo che L-NMMA e L-NAME fossero in grado di revertire del tutto l'effetto inibitorio del DHEA-S sull'aggregazione dipendente da trombina, invece i dati ottenuti pre-trattando le piastrine con gli inibitori (figura 6) non hanno mostrato alcuna variazione rispetto a quelli incubati solo con il DHEA-S. Non possiamo quindi affermare con sicurezza che il DHEA-S sia in grado di alzare i livelli di NO plasmatico.

Visti i risultati ottenuti fino ad ora nel tentativo di completare il meccanismo d'azione del DHEA-S nelle piastrine, per procedere con il lavoro si vuole indagare sul meccanismo di attivazione della guanilato ciclasi.

---

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Labrie, F., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., (2001) *Front Neuroendocrinol* 22:185-212.
2. Jesse, RL., Loesser, K., Eich, DM., Qian, YZ., Hess, ML., Nestler, JE., (1995) *Ann N Y Acad Sci* 774:281-90.
3. Nawata, H., Yanase, T., Goto, K., Okabe, T., Ashida, K., (2002) *Mech Ageing Dev* 123:1101-6.
4. Chang, HJ., Shi, R., Rehse, P., Lin, SX., (2004) *J Biol Chem* 279:2689-96.
5. Porsová-Dutoit, I., Sulcová, J., Stárka, L., (2000) *Physiol Res* 49: S43-56.
6. van Vollenhoven, RF., Engleman, EG., MnGuire, JL., (1994) *Arthritis Rheum* 37:1305-1310.
7. Ribeiro, F., Lopes, RP., Nunes, CP., Maito, F., Bonorino, C., Bauer, ME., (2007) *Biogerontology* 8:209-20.
8. Morgan, CA. 3rd., Southwick, S., Hazlett, G., Rasmusson, A., Hoyt, G., Zimolo, Z., Charney, D., (2004) *Arch Gen Psychiatry* 61:819-25.
9. Labrie, F., Diamond, P., Cusan, L., Gomez, JL., Bélanger, A., Candas, B., (1997) *J Clin Endocrinol Metab* 82:3498-505.
10. Mills, SJ., Ashworth, JJ., Gilliver, SC., Hardman, MJ., Ashcroft, GS., (2005) *J Invest Dermatol* 125:1053-62.
11. Charalampopoulos, I., Alexaki, VI., Lazaridis, I., Dermitzaki, E., Avlonitis, N., Tsatsanis, C., Calogeropoulou, T., Margioris, AN., Castanas, E., Gravanis, A., (2006) *FASEB J* 20:577-9.
12. Mellon, SH., (2007) *Pharmacol Ther* 116:107-24.
13. Martina, V., Benso, A., Gigliardi, VR., Masha, A., Origlia, C., Granata, R., Ghigo, E., (2006) *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:260-4.
14. Liu, D., Dillon, JS., (2002) *J Biol Chem* 277:21379-88.
15. Williams, MR., Dawood, T., Ling, S., Dai, A., Lew, R., Myles, K., Funder, JW., Sudhir, K., Komesaroff, PA., (2004) *J Clin Endocrinol Metab* 89:4708-15.
16. Notelovitz, M., (2002) *Fertil Steril* 77:S34-41.
17. Simoncini, T., Mannella, P., Fornari, L., Varone, G., Caruso, A., Genazzani, AR., (2003) *Endocrinology* 144:3449-55.
18. Marjanovic, JA., Li, Z., Stojanovic, A., Du, X., (2005) *J Biol Chem* 280:37430-8.



- 
19. Richie-Jannetta, R., Busch, J.L., Higgins, K.A., Corbin, J.D., Francis, S.H., (2006) *J Biol Chem.* 281:6977-84.
  20. Hellevuo, K., Yoshimura, M., Mons, N., Hofman, P.L., Cooper, D.M., Tabakoff, B., (1995) *J Biol Chem.* 270:11581-9.
  21. Jin, J., Kunapuli, S.P., (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8070-4.
  22. Hellevuo, K., Welborn, R., Menninger, J.A., Tabakoff, B., (1997) *Am J Med Genet.* 74:95-8.
  23. Zieve, P.D., Greenough, W.B., 3rd., (1969) *Biochem Biophys Res Commun* 35:462-6.
  24. Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Hönig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H., Walter, U., (1998) *J Biol Chem.* 273:20029-35.
  25. Lawrence, D.W., Pryzwansky, K.B., (2001) *J Immunol* 166:5550-6.
  26. Jensen, B.O., Selheim, F., Døskeland, S.O., Gear, A.R., Holmsen, H., (2004) *Blood* 104:2775-82.
  27. Holinstat, M., Voss, B., Bilodeau, M.L., McLaughlin, J.N., Cleator, J., Hamm, H.E., (2006) *J Biol Chem* 281(36):26665-74.
  28. Bernardi, B., Guidetti, G.F., Campus, F., Crittenden, J.R., Graybiel, A.M., Balduini, C., Torti, M., (2006) *Blood* 107:2728-35.
  29. Lova, P., Campus, F., Lombardi, R., Cattaneo, M., Sinigaglia, F., Balduini, C., Torti, M., (2004) *J Biol Chem* 279:25299-306.
  30. Coughlin, S.R., (2005) *J Thromb Haemost* 3:1800-14.
  31. Chen, X., Earley, K., Luo, W., Lin, S.H., Schilling, W.P., (1996) *Biochem. J.* 314:603±611.
  32. Böhm, S.K., Khitin, L.M., Grady, E.F., Aponte, G., Payan, D.G., Bunnett, N.W.J., (1996) *Biol Chem.* 271:22003-16.
  33. Kim, S., Jin, J., Kunapuli, S.P. (2006). *Blood* 1;107(3):947-54.
  34. Nadal-Wollbold, F., Pawlowski, M., Lévy-Toledano, S., Berrou, E., Rosa, J.P., Bryckaert, M., (2002) *FEBS Lett.* 531:475-82.

---

## 7. ATTIVITA' FORMATIVA

### Seminari:

- 20 dicembre 2007  
"Human papillomavirus loads and its correlation with non-melanoma skin cancer" – Dott. Soenke Weissenborg
- 14 gennaio 2008  
" Biologia molecolare e genetica in ambito forense: principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche" - Tenente Dott. Giorgio Portera
- 21 gennaio 2008  
"K<sup>+</sup> channels in the heart: in and out of control" – Dott. Susanne Radicke
- 23 gennaio 2008  
"Integrin trafficking and tumour cell invasiveness" – Dot. Jim Norman
- 24 gennaio 2008  
"La Microscopia a Forza Atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni" – Prof. Mario Raspanti
- 6 febbraio 2008  
"Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo" – Dott. Gianluca DeBellis
- 7 febbraio 2008  
"La proteina HMGB1 é un segnale di danno tissutale" – Prof. M. E. Bianchi
- 21 febbraio 2008  
"New treatment strategies for multiple myeloma" – Prof. A. Palumbo
- 28 febbraio 2008  
"Caratterizzazione molecolare della leucemia linfatica cronica" - Prof. Valter Gattei
- 5 marzo 2008  
"Analytic vaccinology and human cytomegalovirus: human monoclonal antibodies as tools to identify novel antigens for protective vaccination" – Dott. Annalisa Macagno
- 6 marzo 2008  
"Applications of gene expression profiling to cancer research" – Prof. Enzo Medico

- 
- 7 marzo 2008  
“Fatty liver preservation against ischemia-reperfusion injury” - Dott. Joan Rossello Catafau
  - 13 marzo 2008  
“Il sistema Ghrelin: aspetti endocrini e metabolici” – Prof. F. Broglio e C. Gauna
  - 20 marzo 2008  
“Immunologia della psoriasi” - Prof. Giampiero Girolomoni
  - 3 aprile 2008  
“Mutazioni del gene dell’insulina come causa di diabete neonatale/infantile:  
un nuovo esempio di malattia da misfolding” - Prof. Fabrizio Barbetti
  - 9 aprile 2008  
“Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria” - Prof. Gaetano Cairo
  - 14 aprile 2008  
“Interazioni tra tumore e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica: il ruolo della via metabolica del mevalonato” - Prof. Massimo Massaia
  - 16 aprile 2008  
“The herpesvirus DNA polymerases: a model for new antiviral drug discovery” - Prof. Giorgio Palù
  - 17 aprile 2008  
“Epidemiologia dell'infezione da HPV e del cancro della cervice uterina: un modello dinamico” - Dott. Iacopo Baussano
  - 24 aprile 2008  
“Ghrelin e pancreas endocrino” Prof. Riccarda Granata
  - 15 maggio 2008  
“The mechanisms of cell infection with hepatitis C virus- novel potential targets for therapeutic interventions” - Prof. Agata Budkowska
  - 22 maggio 2008  
"La ricerca farmacologica: dal laboratorio alla clinica" - Dott. Domenico Valle
  - 23 maggio 2008  
“Sistema degli Endocannabinoidi: nuovo target terapeutico per l'obesità e le sue complicanze cardio-metaboliche” - Prof. Uberto Pagotto
  - 26 maggio 2008  
“Copy number variations: non solo ritardo mentale” - Prof. Orsetta Zuffardi

- 
- 5 giugno 2008
    - “Cap-Analysis Gene Expression (CAGE) Analysis of transcriptional complexity and regulation” - Dr. Piero Carninci
  - 3 e 11 giugno 2008
    - “Il Trasferimento tecnologico dall'università all'impresa” - Fabrizio Conicella , Kevin Romani e Alberto Baldi
  - 12 giugno 2008
    - “Mechanical Ventilation and Multiple Organ Failure” - Dr. Frans B. Plotz
  - 13 giugno 2008
    - “Problem solving in patologia epatica” - Prof. Gavino Faà
  - 26 giugno 2008
    - “Tecniche FISH nello studio dei linfomi non-Hodgkin” Dott.ssa Maria Grazia Tibiletti
  - 30 giugno 2008
    - “From megakaryocytes to platelets regulation, environment and pathology” - Dott.ssa Alessandra Balduini
  - 3 luglio 2008
    - “Recenti aspetti in tema di malattie uromodulina associate” - Prof. Scolari
  - 1,2 e 16,18 luglio 2008
    - ✓ “Recombinant protein expression”
    - ✓ “Recombinant antibodies and other affinity reagents”
    - ✓ “Display technologies: phage yeast bacteria and ribosoma”
    - ✓ “Fluorescent proteins” - Dr. Andrew Bradbury

---

## SEZIONE 2:

### CORSI FREQUENTATI

Corso di inglese (livello base)

Corso di radioprotezione

### CONGRESSI FREQUENTATI

53° National meeting of Italian Society of Biochemistry and Molecular biology - Riccione, 23-26 settembre 2008

### COMUNICAZIONI A CONGRESSI

#### A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

53° National meeting of Italian Society of Biochemistry and Molecular biology - Riccione, 23-26 settembre 2008

*"Dehydroepiandrosterone inhibits platelet aggregation with a cGMP-dependent mechanism"*

**A. Rastoldo**, C. Sarasso, S. Baldassarri, M. Zanfa, A. Bagarotti, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia (poster).

#### B) Altre comunicazioni

Riunione SIB-LLP 2008, Milano 30 maggio 2008

*"Dehydroepiandrosterone sulfate inhibits platelets aggregation"*

Sarasso C., **Rastoldo A.**, Baldassarri S., Zanfa M., Bertoni A., Sinigaglia F.

CNBX, Perugia 17-19 settembre 2008

*"Inhibition of platelet aggregation by the phytoestrogen 8-prenylnaringenin"*

M. Zanfa, S. Baldassarri, C. Sarasso, A. Bagarotti, **A. Rastoldo**, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia

CNBX, Perugia 17-19 settembre 2008

*"Different expression of estrogen receptors gpr30 and ERβ isoforms in megakaryoblastic and erythroleukemia cell lines"*

S. Bergante, A. Bagarotti, C. Di Vito, S. Baldassarri, **A. Rastoldo**, M. Zanfa, F. Sinigaglia and A. Bertoni

9<sup>a</sup> Riunione del Gruppo di Studio Piastrine, S. Pellegrino Terme 12-14 ottobre 2008

*"Study of the mechanisms of platelet inhibition induced by the phytoestrogen 8-PN"*

M. Zanfa, S. Baldassarri, C. Sarasso, A. Bagarotti, **A. Rastoldo**, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia

---

9<sup>a</sup> Riunione del Gruppo di Studio Piastrine, S. Pellegrino Terme 12-14 ottobre 2008

*“The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-  
CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> receptors”*

S. Baldassarri, A. Bertoni, A. Bagarotti, C. Sarasso, M. Zanfa, **A. Rastoldo**, C. Di Vito,  
M.V. Catani, L. Avigliano, M. Maccarrone, M. Torti, F. Sinigaglia