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



Dottorato di Ricerca

in

Medicina Molecolare

Ciclo XXIII

Relazione 2° anno

TITOLO:

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

Candidato: Rastoldo Alessandro

Tutor: Prof. Sinigaglia Fabiola

INDICE

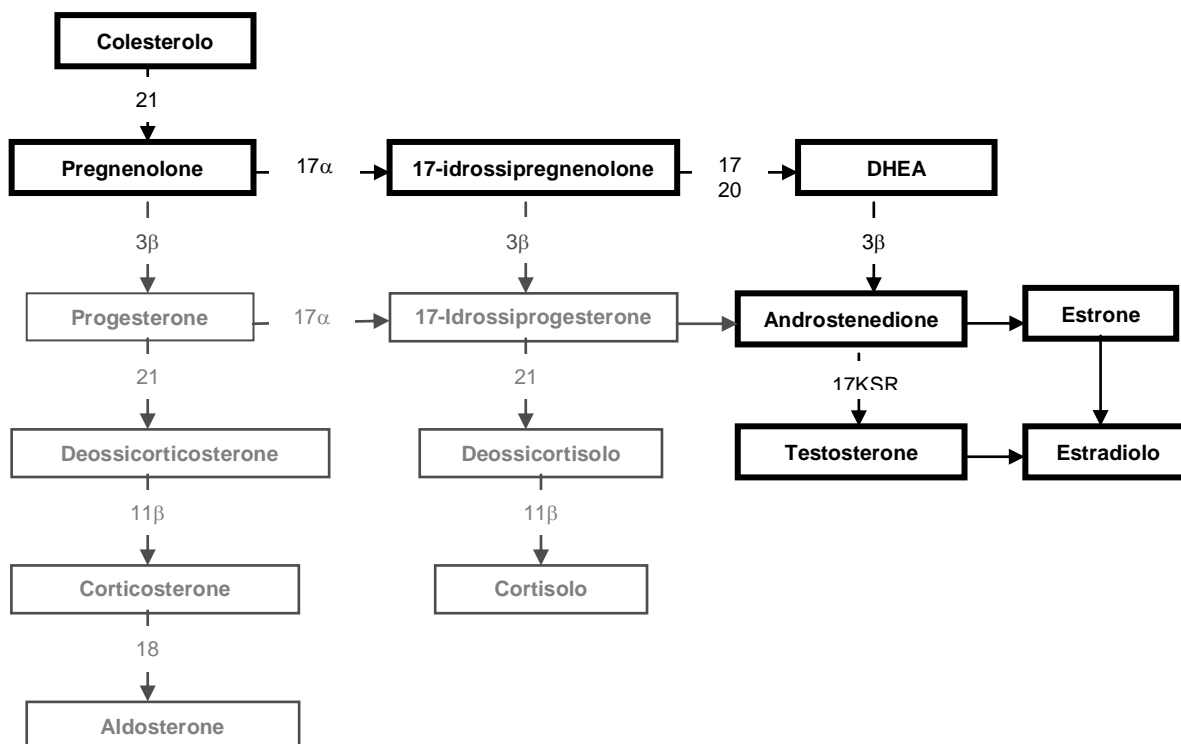
1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 Deidroepiandrosterone	3
1.2 Meccanismi d'azione del DHEA.....	5
1.3 Trombina	7
2. SCOPO DEL LAVORO	8
3.MATERIALI E METODI	9
3.1 Materiali	9
3.2 Isolamento delle piastrine.....	9
3.3 Analisi dell'aggregazione piastrinica e della secrezione di ATP	10
3.4 Elettroforesi ed immunoblotting	10
4. RISULTATI	11
4.1 Effetto del DHEA e del DHEA-S sull'aggregazione piastrinica indotta da trombina	11
4.2 Effetto del DHEA-S sulla secrezione dai granuli densi e sulla fosforilazione proteica indotta da trombina	15
4.3 Effetto del DHEA-S sulla fosforilazione di VASP	17
4.4 Effetto del DHEA-S sugli enzimi coinvolti nella via del cGMP	19
5. DISCUSSIONE	22
6. BIBLIOGRAFIA	24
7. ATTIVITA' FORMATIVA	27

SEZIONE 1
RISULTATI SCIENTIFICI

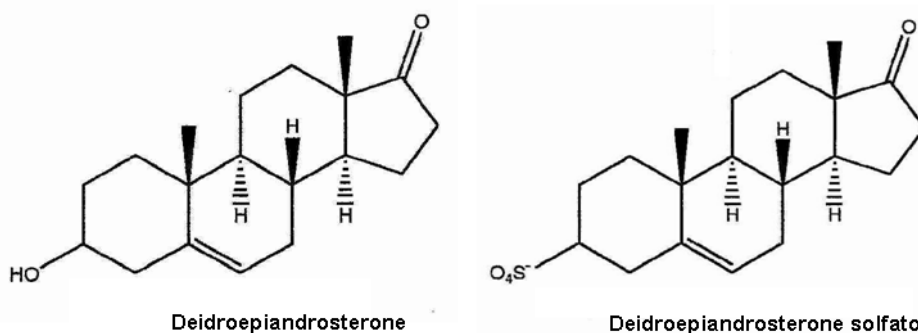
1. INTRODUZIONE

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 17α -idrossilasi catalizza la seconda reazione di idrossilazione che converte il pregnenolone in 17α -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 ventuno 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, PGI₂, PGE₁, e PGD₂ si leghino ai rispettivi recettori di membrana per stimolare, attraverso la subunità G_{αs} 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_{αi} (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 serina¹⁵⁷, serina²³⁹ e sulla treonina²⁷⁸, ma se la via attivata è GMP ciclico dipendente il sito maggiormente fosforilato è sulla serina²³⁹, mentre se la via è AMP ciclico dipendente il principale sito coinvolto è sulla serina¹⁵⁷. 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 NH₂-terminale dei recettori PAR esponendo una nuova sequenza NH₂-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 A₂, 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 α 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) attraverso l'aumento del GMP ciclico che porta alla fosforilazione inibitoria della proteina VASP.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

Sodio Nitroprussiato (SNP) acquistato dalla Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). I kit cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA), cGMP[H³] Radioimmunoassay (RIA), hybond-P polyvinylidene difluoride (PVDF) membrana per il trasferimento acquistati dalla Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). L'anticorpo monoclonale anti-VASP-P239 anti-topo, l'anticorpo policlonale anti-VASP anti-coniglio, N^G-Monomethyl-L-arginine, Monoacetate Salt (L-NMMA), N^G-Nitro-L-arginine Methyl Ester (L-NAME), forniti dalla Calbiochem (San Diego, CA). Gli anticorpi policlonali anti-fosfo-p44/42 MAP chinasi (Thr202/Tyr204) e anti-fosfo-P38 forniti dalla Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Reagenti CHRONO-LUME forniti dalla CHRONO-LOG Corporation (Havertown, PA). Digitonina dalla Fluka (Buchs, Switzerland). L'anticorpo monoclonale anti-Actina fornito dalla Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anticorpo policlonale anti-Src chinasi (Tyr418), trombina, deidroepiandrosterone 3-solfato (DHEA-S), 3-β-Hydroxy-5-androsten-17-on (DHEA), estrone sulfamato e forskolina forniti dalla Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO). 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinozalin-1-one (ODQ), ICI 182,780 e KT5823 acquistati dalla Tocris Bioscience (Bristol, UK).

Metodi

3.2 Isolamento delle piastrine

I campioni di sangue provengono da volontari sani 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 NaHCO₃). Le piastrine ottenute vengono quindi contate al microscopio ottico su camera di Burkner e portate alla concentrazione desiderata in Tyrode.

3.3 Analisi dell'aggregazione piastrinica e della secrezione di ATP

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 3×10^8 /ml sono addizionate di glucosio (5,5 mM), CaCl₂ (2 mM) e MgCl₂ (2 mM) e lasciate riposare 30 minuti a temperatura ambiente prima di iniziare l'esperimento. Campioni da 400 µl vengono preincubati per 1 minuto con DHEA (10 nM) o 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. In alcuni esperimenti le piastrine sono state incubate con gli inibitori (10 µM) ICI 182,780, (0,3 mM) L-NMMA, (0,3 mM) L-NAME per 30 minuti, (2 µM) ODQ per 5 minuti, (10 µM) EMATE e (2 µM) KT5823 per 1 minuto prima dello stimolo con DHEA-S. La misurazione della secrezione dai granuli piastrinici è stata effettuata aggiungendo luciferina-luciferasi (reagente CHRONO-LUME) dopo i 5 minuti dalla stimolazione con trombina.

3.4 Elettroforesi ed immunoblotting

Piastrine gel-filtrate sono portate alla concentrazione di 1×10^9 /ml, addizionate di glucosio (5,5 mM) e lasciate riposare per 30 minuti a temperatura ambiente.

Campioni da 100 µl sono incubati per diversi tempi da 15 secondi a 10 minuti a 37° C con 0,3 mM DHEA-S. In alcuni esperimenti questo trattamento è stato preceduto da preincubazione con ODQ, mentre in altri è stato effettuato uno stimolo con 0,05 U/ml trombina per 1 minuto. Le cellule vengono lisate in ghiaccio con Laemly Buffer 3x (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-fosfo-p44/42ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), anti-fosfo-p38 MAPK, anti-pTyr⁴¹⁸ Src chinasi, anti-VASP-Pser239, anti-VASP e anti-actina.

4. RISULTATI

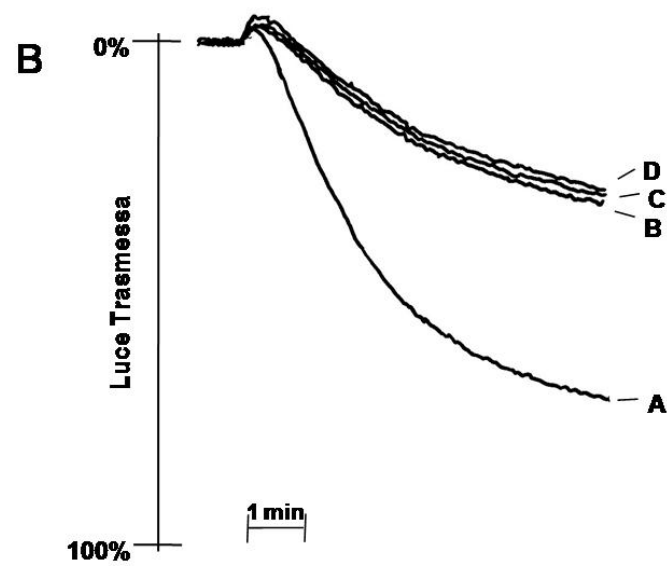
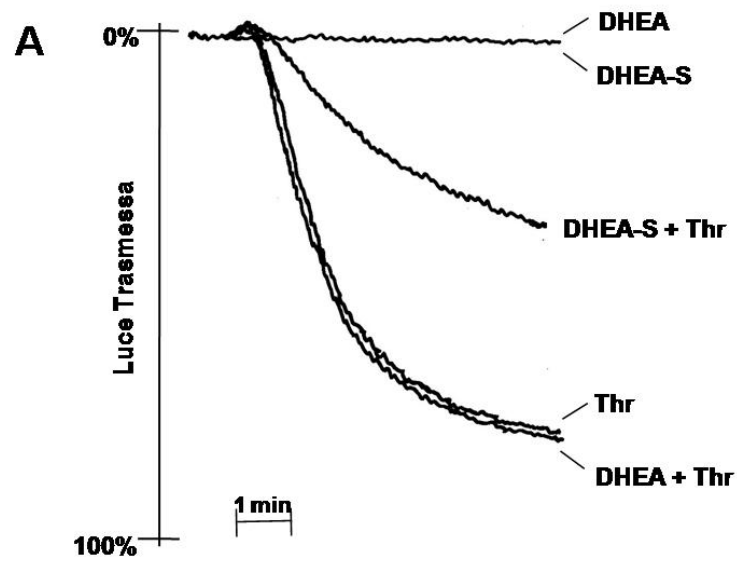
4.1 Effetto del DHEA e del DHEA-S sull'aggregazione piastrinica indotta da trombina

Il primo obiettivo di questo progetto è stato studiare quali fossero gli effetti del DHEA e del DHEA-S sull'aggregazione piastrinica indotta da un agonista forte come la trombina. Per questo motivo, piastrine preparate mediante gel-filtrazione sono state pre-incubate con tampone, con (10 nM) DHEA o con (0,3 mM) DHEA-S per 1 minuto a 37° C e poi stimulate con (0,05 U/ml) trombina. In figura 1A sono riportati dei tracciati di aggregazione relativi ad un esperimento rappresentativo di tre condotti con lo scopo di identificare la percentuale di aggregazione dipendente da trombina in campioni pre-incubati con DHEA o DHEA-S. Dagli esperimenti svolti emerge che la forma attiva dell'ormone (DHEA) non è in grado di modificare la percentuale di aggregazione, mentre la forma solfata porta ad una apprezzabile riduzione dell'aggregazione piastrinica indotta da trombina (come già precedentemente dimostrato questa inibizione è fortemente dipendente dalla concentrazione di trombina utilizzata). Abbiamo poi considerato se il DHEA-S doveva essere metabolizzato dalle estrogeno/DHEA solfatasi piastriniche a DHEA per poter agire. I campioni di piastrine sono così stati preincubati con (10 µM) EMATE, un inibitore delle estrogeno/DHEA solfatasi, trattati con DHEA-S e stimolati con trombina (figura 1B). Dalla figura si può notare che comunque in presenza o in assenza di EMATE l'aggregazione dipendente da trombina è inibita allo stesso modo che risulta così essere dipendente dalla forma solfata dell'ormone. Da questa prima serie di esperimenti si può concludere che la somministrazione *in vitro* di DHEA-S è in grado di agire negativamente sui segnali attivatori indotti da trombina.

In letteratura è ormai noto da tempo che in cellule endoteliali il DHEA può legarsi al recettore degli estrogeni per dare effetti analoghi a questo ormone (33). Inoltre, questo tipo di recettore è presente anche nelle piastrine umane e, in particolare, l'isoforma β (ER β) risulta essere quella maggiormente espressa (34, 35). Abbiamo così valutato in aggregometria quale ruolo avesse il recettore degli estrogeni piastrinico nei confronti del DHEA-S. Piastrine gel-filtrate sono state pre-incubate con (10 µM) ICI 182,780 e con (0,3 mM) DHEA-S prima di essere stimulate con 0,05 U/ml trombina (figura 1B). ICI 182,780 lega ER β e inibisce l'effetto del

17 β -estradiolo in diversi tipi cellulari incluse le piastrine (36); nel nostro caso questo tipo di trattamento non è in grado di modificare l'aggregazione piastrinica indotta da trombina in presenza di DHEA-S. Possiamo in questo modo escludere l'interazione del DHEA-S con il recettore degli estrogeni.

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 (0,025 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 0,025 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).



Traccia	Trattamento	Aggregazione %
A	Thr	100
B	DHEA-S + Thr	52.1 ± 2.6
C	EMATE + DHEA-S + Thr	50.3 ± 3.7
D	ICI182,780 + DHEA-S + Thr	49.5 ± 5.2

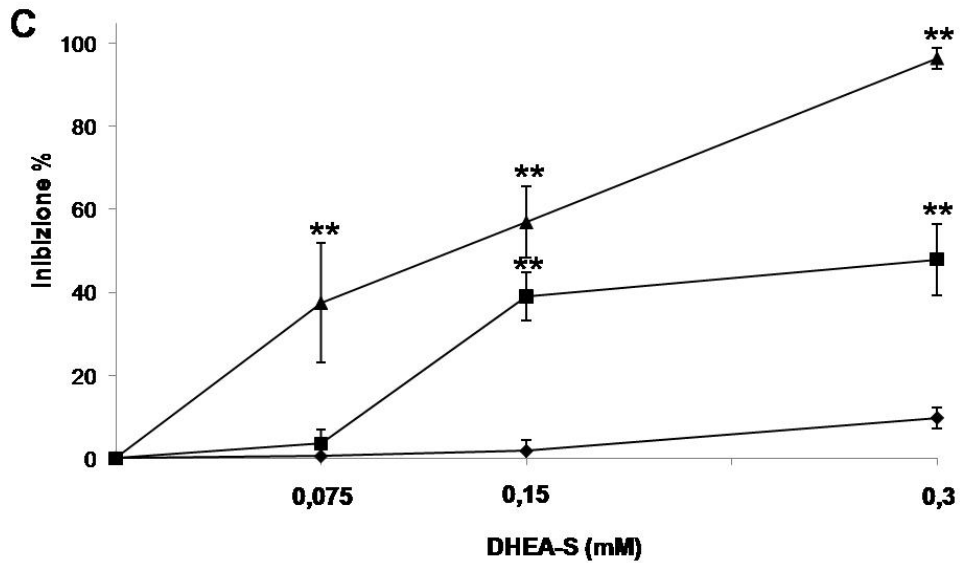


Figura 1. Il DHEA-S riduce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina. **A)** Campioni di piastrine gel filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono pre-incubati con tampone, 10 nM DHEA o con 0,3 mM DHEA-S per 1 minuto a 37°C e stimolati con 0,05 U/ml trombina. **B)** Campioni di piastrine gel filtrate sono pre-incubati con tampone (tracciato A), con 0,3 mM DHEA-S (tracciato B), con 10 μM EMATE e 0,3 mM DHEA-S (tracciato C) o con 10 μM ICI 182,780 e 0,3 mM DHEA-S e successivamente stimolati con 0,05 U/ml trombina. In figura **A** e **B** sono riportate le tracce di aggregazione ottenute in uno dei tre esperimenti eseguiti su piastrine isolate da diversi donatori. **C)** Piastrine gel-filtrate sono state pre-incubate con il tampone o con concentrazioni crescenti di DHEA-S (0,075 mM, 0,15 mM e 0,3 mM) per 1 minuto e poi stimolate con dosi crescenti di trombina (0,025 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. (** $P < 0,01$).

4.2 Effetto del DHEA-S sulla secrezione dai granuli densi e sulla fosforilazione proteica indotta da trombina

Gli agonisti piastrinici, e in particolare la trombina, sono in grado di attivare dei meccanismi che portano alla fosforilazione diverse proteine chinasi come Src (37) e le MAP chinasi ERK 1/2 (38) e p38 MAPK (39). In seguito alla stimolazione con trombina si ha quindi la conseguente attivazione di queste proteine porta al rilascio del contenuto dei granuli densi (ADP) (40). Per valutare l'effetto del DHEA-S sulla secrezione dai granuli, in aggregometria, piastrine pre-incubate con 0,3 mM DHEA-S sono state stimolate con trombina e dopo aver seguito l'andamento del tracciato per 5 minuti è stata misurata la quantità di ATP secreta aggiungendo al sistema Luciferina-Luciferasi (figura 2A). E' emerso che il DHEA-S non solo inibisce l'aggregazione ma anche la secrezione dai granuli. Questo dato ci ha permesso di ipotizzare che, in presenza di DHEA-S, la fosforilazione di ERK 1/2 e p38 MAPK, indotta da trombina, poteva essere ridotta come conseguenza di una ridotta secrezione di ADP o ridotta attivazione di Src.

Per verificare questa ipotesi campioni di piastrine sono stati pre-incubati a 37 °C con veicolo o con 0,3 mM DHEA-S per 1 minuto e successivamente stimolati con 0,05 U/ml trombina da 15 a 180 secondi e successivamente analizzati in immunoblotting con anticorpi specifici per le forme fosforilate p38 MAPK, ERK1/2 and pTyr⁴¹⁸-Src. In figura 2B si può notare come in presenza di DHEA-S la fosforilazione di Src, ERK1/2 e p38 MAPK causata da trombina è notevolmente diminuita. Concludendo i nostri risultati indicano che in presenza di DHEA-S sia la secrezione dai granuli che la fosforilazione proteica indotta da trombina sono ridotte ma non inibite totalmente.

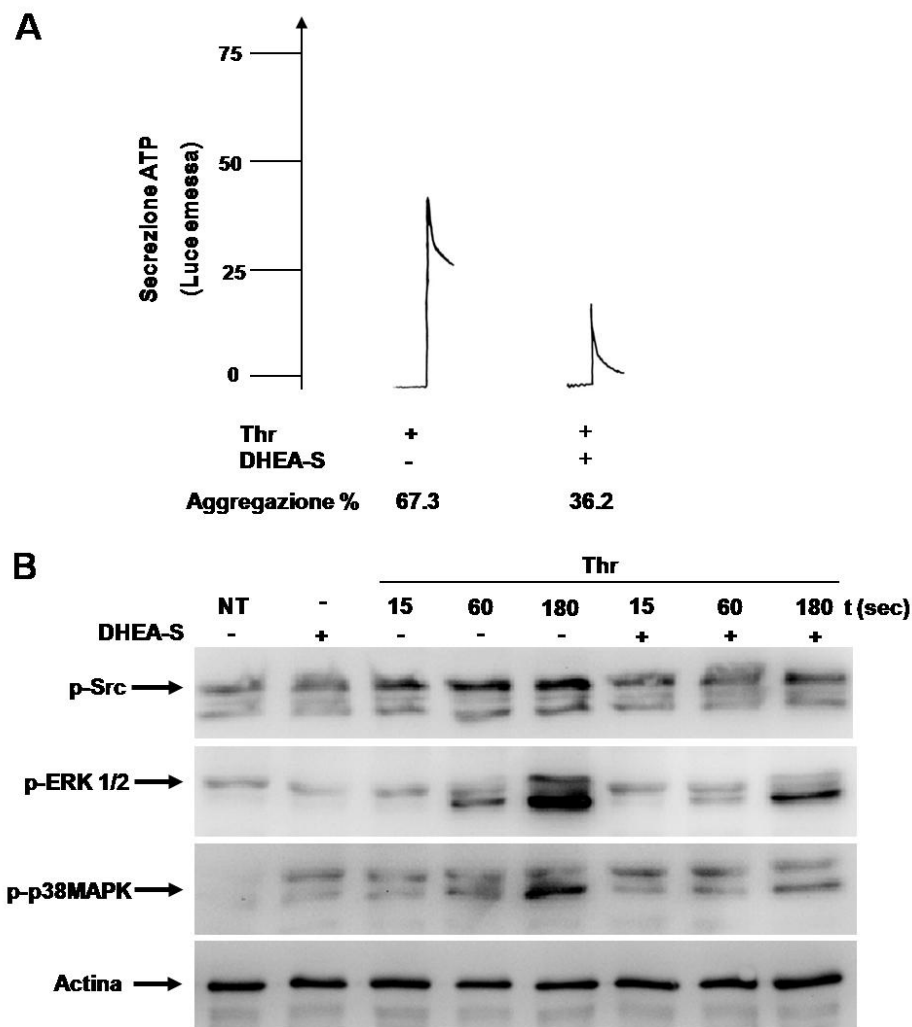


Figura 2. DHEA-S porta a riduzione della secrezione dai granuli e della fosforilazione proteica. (A) Misurazione della secrezione di ATP con reagenti CHRONO-LUME in campioni di piastrine (3×10^8) pre-incubate con 0,3 mM DHEA-S o con veicolo dopo 5 minuti di trattamento con 0,05 U/ml trombina. **(B)** Campioni di piastrine gel-filtrate concentrati 1×10^9 /ml sono stati pre-incubati con 0,3 mM DHEA-S per 1 minuto e successivamente stimolati con 0,05 U/ml di trombina da 15 a 180 secondi a 37° C. Aliquote di ogni campione sono analizzate in immunoblotting utilizzando anticorpi anti-Src, anti-pERK1/2, anti-p38MAPK, anti-actina. In figura (A e B) è riportato un esperimento significativo di 3 condotti su piastrine di diversi donatori.

4.3 Effetto del DHEA-S sulla fosforilazione di VASP

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 serina¹⁵⁷ e serina²³⁹) 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 1 minuto a 10 minuti a 37° C con il tampone (NT) o con DHEA-S 0,3 mM. I lisati ottenuti sono stati analizzati in immunoblotting con anticorpi anti-pSer239-VASP e anti-VASP. Abbiamo così potuto confermare che il DHEA-S promuove una robusta fosforilazione della proteina VASP con meccanismo tempo dipendente (fig. 3).

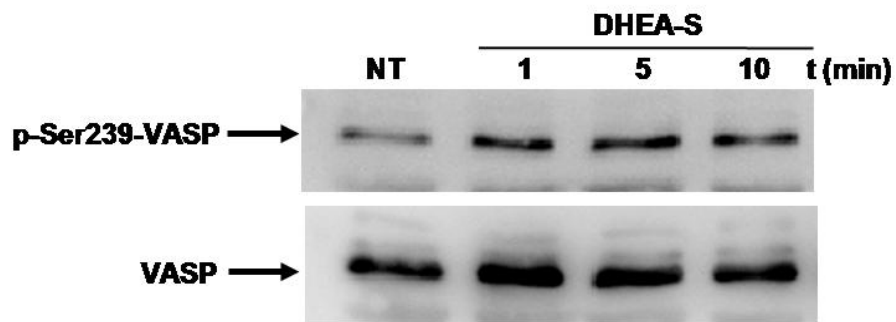
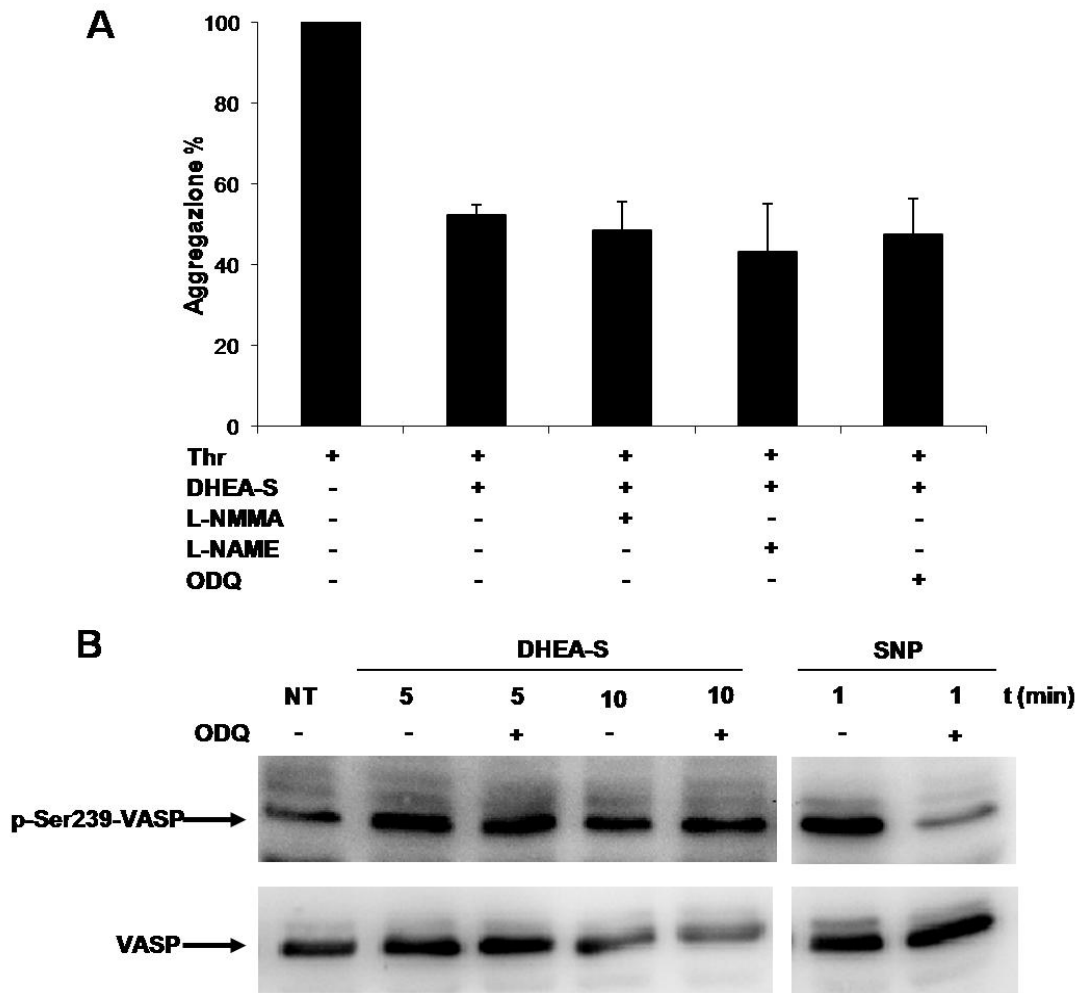


Figura 3. Fosforilazione di VASP tempo dipendente. Piastrine gel-filtrate concentrate 1×10^9 /ml sono state stimulate con tampone (NT) o stimolati a 37°C con 0,3 mM DHEA-S per tempi crescenti da 1 a 10 minuti. Per valutare fosforilazione e l'andamento della proteina totale, una frazione di ogni campione è stata analizzata in immunoblotting utilizzando anticorpi anti-VASP P-Ser239 e anti-VASP. I risultati mostrati in figura sono stati ottenuti in uno dei tre identici esperimenti condotti su piastrine di diversi donatori.

4.4 Effetto del DHEA-S sugli enzimi coinvolti nella via del cGMP

Dati mostrati nella precedente relazione riportano come il DHEA-S sia in grado di aumentare i livelli di cGMP ma non cAMP in piastrine gel-filtrate. Dati preliminari mostrano anche l'impiego di inibitori competitivi delle NO-sintasi (NOS), L-NMMA e L-NAME, utilizzati per scoprire se l'aumento dei livelli di cGMP dipendono dalla produzione di NO. Per continuare lo studio di questa via abbiamo considerato anche l'attivazione della guanilato ciclasi solubile (sGC) e della proteina chinasi cGMP dipendente (PKG). Sono così stati utilizzati un inibitore specifico per la sGC, l'ODQ, e un nucleotide analogo al cGMP con caratteristiche antagonizzanti, il KT5823. Campioni di piastrine gel-filtrate, alla concentrazione di 3×10^8 /ml, sono stati pre-incubati con 0,3 mM L-NMMA, 0,3 mM L-NAME per 30 minuti o con 2 μ M ODQ per 5 minuti, trattati con 0,3 mM DHEA-S o con il solo tampone per 1 minuto e successivamente stimolati con 0,05 U/ml trombina a 37° C (figura 4A). 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 1A), mentre il pretrattamento dei campioni con gli inibitori L-NMMA, L-NAME o ODQ non porta ad una reversione degli effetti del DHEA-S su questo tipo esperimento (figura 4A). 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) e della sGC. Per poter confermare l'effetto dell'ODQ abbiamo poi considerato la fosforilazione della proteina VASP indotta da DHEA-S (figura 4B). Piastrine alla concentrazione di 1×10^9 /ml sono state pre-trattate o no con 2 μ M ODQ e successivamente incubate con DHEA-S per 5 e 10 minuti a 37° C. Come controllo è stato usato un donatore di NO, il sodio nitroprussiato (SNP, 1 μ M) per 1 minuto. Dall'immagine 4B si può notare come l'ODQ sia in grado di prevenire totalmente la fosforilazione di VASP nel campione trattato con SNP, mentre non è in grado di portare ad una comparabile inibizione in campioni trattati con DHEA-S. Queste evidenze, insieme alle precedenti, portano ad ipotizzare che il DHEA-S possa agire come modulatore negativo delle cGMP fosfodiesterasi piastriniche. Per proseguire lo studio di questa via, recenti esperimenti di aggregazione vedono l'impiego dell'inibitore di PKG, KT5823. Piastrine (3×10^8 /ml) sono state pre-incubate con veicolo o con 2 μ M KT5823 per 1 minuto, incubate con DHEA-S per 1 minuto ed in fine stimolate con trombina. Dall'immagine 4C si può notare come l'uso di questo tipo di inibitore permetta di ottenere una reversione dell'effetto inibitorio del DHEA-S nei confronti dell'aggregazione piastrinica indotta da trombina. Questo tipo di risultato è in accordo con l'aumento dei livelli

di cGMP precedentemente identificati e avvalora l'ipotesi di una possibile inibizione DHEA-S-dipendente delle fosfodiesterasi piastriniche dipendenti dai livelli di cGMP.



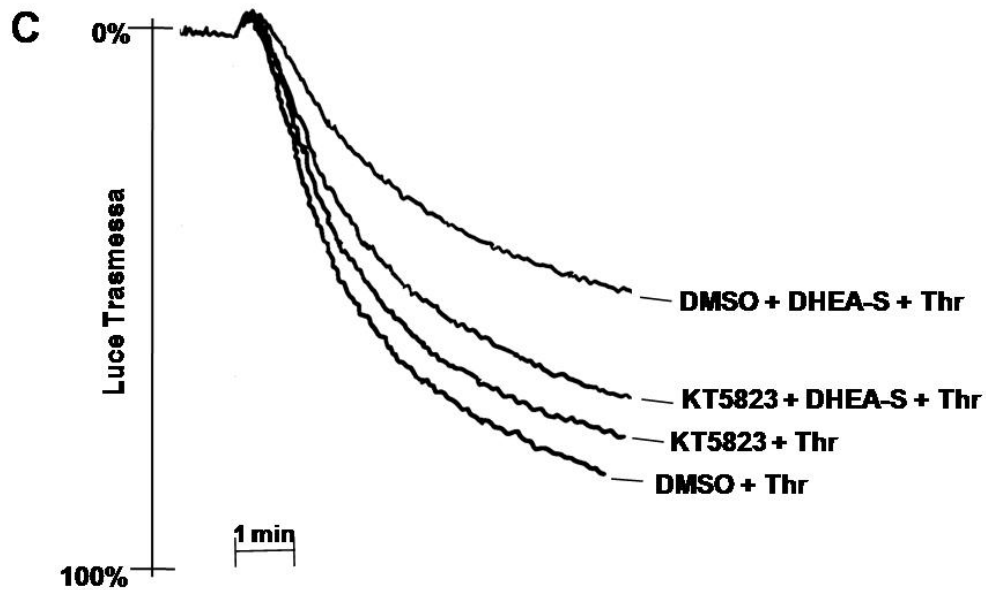


Figura 6. DHEA-S agisce indipendentemente alle NOS e alla sGC, ma coinvolgendo la PKG. (A) Piastrine gel-filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono pre-incubate con 0,3 mM L-NMMA, con 0,3 mM L-NAME per 30 minuti, o con 2 μ M ODQ per 5 minuti, trattate con 0,3 mM DHEA-S per 1 minuto e stimolate con 0,05 U/ml 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. (B) Piastrine gel-filtrate concentrate 1×10^9 /ml sono state pre-incubate con 2 μ M ODQ per 5 minuti, stimolate con tampone (NT) o con 0,3 mM DHEA-S per 5 e 10 minuti a 37° C. Per valutare fosforilazione e l'andamento della proteina totale, una frazione di ogni campione è stata analizzata in immunoblotting utilizzando anticorpi anti-VASP P_{Ser239} e anti-VASP. (C) Campioni di piastrine gel filtrate sono pre-incubati con tampone (tracciato A), con 2 μ M KT5823 (tracciato B), con KT5823 e DHEA-S (tracciato C), con tampone e (0,3 mM) DHEA-S (tracciato D) e successivamente stimolati con (0,05 U/ml) trombina. In figura B e C i risultati mostrati sono stati ottenuti in uno dei tre identici esperimenti condotti su piastrine di diversi donatori.

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, la forma solfata, DHEA-S, è risultata quella in grado di dare un effetto sull'aggregazione piastrinica. Ci siamo occupati di valutare gli effetti del DHEA e del DHEA-S sull'aggregazione indotta da trombina, un forte agonista piastrinico, ed è emerso che il DHEA-S è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica in modo dose-dipendente (figura 1A). Con l'utilizzo degli inibitori ICI 182,780 ed EMATE abbiamo escluso il reclutamento del recettore degli estrogeni e il coinvolgimento delle estrogeno/DHEA sulfatasi, rispettivamente. Confermata l'azione diretta del DHEA-S abbiamo valutato l'efficacia di questo ormone nei confronti dell'inibizione piastrinica trombina dipendente. Da esperimenti di dose risposta è emerso che la concentrazione più alta utilizzata di DHEA-S (0,3 mM) inibisce completamente l'aggregazione dipendente da trombina 0,025 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 1C). In seguito a questi esperimenti abbiamo poi appreso che lo stimolo con DHEA-S interferisce negativamente con i segnali che portano ad attivazione piastrinica. In particolare abbiamo identificato un riduzione della secrezione dai granuli densi contenuti nelle piastrine e una inibizione della fosforilazione di proteine presenti sulla cascata attivatoria (figura 2).

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 serina¹⁵⁷ e serina²³⁹) risulta inattiva e si dissocia dalle componenti citoscheletriche. Dai dati ottenuti in figura 3 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. Precedentemente è stato dosato il contenuto in nucleotidi ciclici cAMP e cGMP di piastrine pre-incubate con DHEA-S ed è risultato un aumento nei livelli di cGMP DHEA-S-dipendente. In letteratura è riportato che il DHEA 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 l'effetto inibitorio del DHEA-S sull'aggregazione dipendente da trombina, invece i dati ottenuti pre-trattando le piastrine con gli inibitori (figura 4) non hanno mostrato alcuna variazione rispetto a quelli incubati solo con il DHEA-S. Allo stesso modo abbiamo valutato l'attivazione della guanilato ciclasi solubile ma anche in questo caso il risultato è stato opposto alle nostre aspettative. In fine abbiamo considerato l'attivazione della proteina chinasi cGMP dipendente; in questo caso, dagli esperimenti di aggregazione effettuati emerge una quasi completa reversione degli effetti DHEA-S indotti. Alla luce di questi dati possiamo ipotizzare che il DHEA-S agisca influenzando negativamente le fosfodiesterasi cGMP-dipendenti, contribuendo così a mantenere alti i livelli di cGMP e quindi prolungando la fase inibitoria.

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. Hayashi T., Esaki T., Muto E., Kano H., Asai Y., Thakur N.K., Sumi D., Jayachandran M., Iguchi A., (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:782-792.
 34. Khetawat G., Faraday N., Nealen M.L., Vijayan K.V., Bolton E., Noga S.J., Bray P.F., (2000) *Blood.* 95:2289-96.
 35. Reineri S., Bertoni A., Sanna E., Baldassarri S., Sarasso C., Zanfa M., Canobbio I., Torti M., Sinigaglia F., (2007) *Biochim Biophys Acta.* 1773:273-8.
 36. Wakeling A.E., Dukes M., Bowler J., (1991) *Cancer Research.* 51:3867-3873.
 37. Golden A., Brugge J.S., (1989) *Cell Biology.* 86:901-905.
 38. Kramer R.M., Roberts E.F., Striffler B.A., Johnstone E.M., (1995) *J Biol Chem.* 270:27395-27398.

39. Papkoff J., Chen R.H., Blenis J., Forsman J., (1994) *Mol Cell Biol.* 14:463-472.

40. Adam F., Kauskot A., Rosa J.-P., Bryckaert M., (2008) *J Thromb and Haemost.* 6:2007–2016.

7. ATTIVITA' FORMATIVA

Seminari 2008/2009:

Production of bio-farmaceuticals in plants

Prof. Luca Santi

05/12/08

Le cellule Mesenchimali Staminali per il trattamento delle malattie neurologiche

Dott. Antonio Uccelli

12/12/08

Patologia della radice aortica: dalla clinica alla biologia molecolare"

Prof. Giuseppe Faggian

18/12/08

La malattia celiaca

Dott. Riccardo Troncone

09/01/09

Porpora trombocitopenica autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici

Dott. Francesco Zaja

13/01/09

Interazioni geni - ambiente nella eziologia della sclerosi multipla: studi sui gemelli

Dott. Marco Salvetti

27/01/09

*NON SOLO MOTONEURONI: IL CONTRIBUTO DEL MUSCOLO SCHELETRICO ALLA
PATOGENESI DELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA*

Prof. Antonio Musarò

12/02/09

*Ruolo dei polimorfismi dei geni della pigmentazione nell'induzione di mutazioni somatiche
nei melanomi*

Prof.ssa G. Bianchi Scarra'

12/02/09

*When a fine tuner of signaling pathways becomes a dangerous amplifier: the case of the
Prolyl-isomerase Pin1 in cancer*

Prof. G. Del Sal

20/02/09

Linee guida per il riscontro diagnostico sulla morte improvvisa

Prof. Gaetano Thiene

25/02/09

LA PROTEOMICA: UN NUOVO MODO DI GUARDARE AL MONDO DELLE PROTEINE

Prof. Piero Pucci

CELLULE STAMINALI TUMORALI: IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE

Prof. Giorgio Stassi

18/03/09

Le nanotecnologie applicate alla medicina

Prof. G. Peluso

19/03/09

Regulation of integrin functions in vascular systems

Prof. F. Bussolino

26/03/09

Enzima P e il Social Network per l'Innovazione

Dott. Salvatore Timpanaro

28/03/09

I bioreattori nella Medicina Rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up

Dott.ssa S. Mantero

9/04/09

Patologia dei tumori cerebrali. Recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi

Dott. Davide Schiffer

22/04/09

Polycystin-1, the product of the PKD1 gene mutated in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD), is an orphan receptor regulating cell migration and polarity

Dott.ssa Anna Boletta

28/04/09

Polarized inflammation in tumour development

Prof. Antonio Sica

30/04/09

Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo

Prof. Amedeo Columbano

05/06/09

Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana

Prof. Giuseppe Poli

Neurotossicità delle proteine 'misfolded' nelle malattie del motoneurone

Prof. Angelo Poletti

12/05/09

The molecular bases of chromosome segregation

dr. Andrea Musacchio

14/05/08

Il Doping ormonale: aspetti clinici e legislativi

Prof. L. Di Luigi

21/05/09

Role of Raf in tumorigenesis

Prof. M. Baccharini

03/06/09

Marcatori molecolari nel carcinoma coloretale: dalla teoria alla pratica clinica

M. Frattini

10/06/09

Il Lupus Eritematoso Cutaneo: quadro clinico ed immunopatologico

Prof. E. Berti

06/07/09

Targeting met in cancer and metastasis: a matter of addiction and sensitivity

Prof.ssa S. Giordano (Università di Torino e IRCC Candiolo)

9/07/09

SEZIONE 2:

PARTECIPAZIONE AI CONGRESSI:

22^a RIUNIONE NAZIONALE “A. Castellani” DEI DOTTORANDI DI RICERCA IN DISCIPLINE BIOCHIMICHE. Brallo di Pregola, 9-12 giugno 2009.

COMUNICAZIONI A CONGRESSI

A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

22^a RIUNIONE NAZIONALE “A. Castellani” DEI DOTTORANDI DI RICERCA IN DISCIPLINE BIOCHIMICHE. Brallo di Pregola, 9-12 giugno 2009. “*INHIBITION OF THROMBIN INDUCED PLATELET AGGREGATION BY DEHYDROEPIANDROSTERONE-SULFATE*”. **A. Rastoldo**. (orale).

B) Altre comunicazioni

9a 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

9a Riunione del Gruppo di Studio Piastrine, S. Pellegrino Terme 12-14 ottobre 2008
“*THE ENDOCANNABINOID 2-ARACHIDONOYLGLYCEROL ACTIVATES HUMAN PLATELETS THROUGH NON-CB1/CB2 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

Platelets 2008: 5th International Symposium. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA. October 15-18.
“*ESTROGEN AND ITS PRECURSOR DEHYDROEPIANDROSTERONE DIRECTLY AFFECT PLATELET FUNCTION WITH OPPOSITE EFFECTS*”
A. Rastoldo, C. Sarasso, S. Reneri, S. Baldassarri, M. Zanfa, A. Bagarotti, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia (poster)

Platelets 2008: 5th International Symposium. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA. October 15-18.
“*THE ENDOCANNABINOID 2-ARACHIDONOYLGLYCEROL ACTIVATES HUMAN PLATELETS THROUGH NON-CB1/CB2 RECEPTORS*”
A. Bertoni, S. Baldassarri, A. Bagarotti, C. Sarasso, M. Zanfa, **A. Rastoldo**, C. Di Vito, M. Torti, F. Sinigaglia

21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai 2-7 Agosto 2009

“INHIBITION OF THROMBIN INDUCED PLATELET AGGREGATION BY DEHYDROEPIANDROSTERONE-SULFATE”

Rastoldo Alessandro, Sarasso Chiara, Bagarotti Alessandra, Di Vito Clara, Bertoni Alessandra, Sinigaglia Fabiola (poster)

54th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB), Catania 23-27 Settembre 2009

“ANALYSIS OF EXPRESSION OF CLASSICAL ESTROGEN RECEPTORS AND GPR30 DURING MEGAKARYOBLASTIC DIFFERENTIATION”

C. Di Vito, S. Bergante, **A. Rastoldo**, A. Bagarotti, A. Bertoni, F. Sinigaglia