

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



Dottorato di Ricerca

in

Medicina Molecolare

Ciclo XXVI

Relazione 1° anno

TITOLO:

**Il deidroepiandrosterone-solfato inibisce
l'aggregazione piastrinica modulando selettivamente
il rilascio del contenuto dei granuli densi**

Candidato: Nalin Michela
Tutor: Prof. Sinigaglia Fabiola

INDICE

INDICE	2
SEZIONE 1-RISULTATI SCIENTIFICI.....	3
1.INTRODUZIONE.....	3
1.1 Deidroepiandrosterone	3
1.2 Meccanismi d'azione del DHEA	6
1.3 Segnalazione piastrinica	8
Attivazione piastrinica	8
Ruolo delle tirosin chinasi.....	10
1.4 Inibizione piastrinica	11
2. SCOPO DEL LAVORO	13
3.MATERIALI E METODI.....	14
3.1 Materiali.....	14
3.2 Isolamento delle piastrine.....	14
3.3 Analisi dell'aggregazione piastrinica	15
3.4 Elettroforesi ed immunoblotting.....	15
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	16
4. RISULTATI.....	16
Effetto del DHEA-S sull'attivazione piastrinica.....	16
Il DHEA-S inibisce la secrezione del contenuto dei granuli densi	18
5. DISCUSSIONE.....	23
6. BIBLIOGRAFIA.....	25
SEZIONE 2:.....	31
PARTECIPAZIONI A CONGRESSI:.....	31
COMUNICAZIONI A CONGRESSI :	32
ARTICOLI SCIENTIFICI PRODOTTI NEL CORSO DEL DOTTORATO:	33

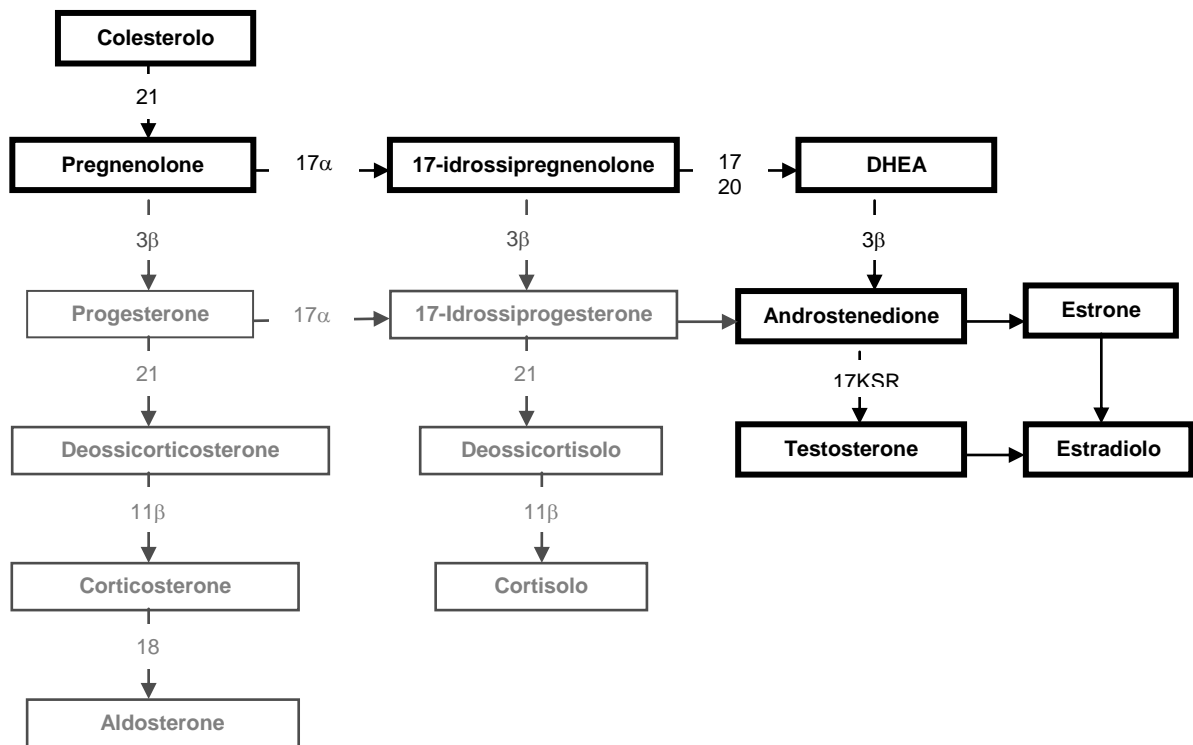
SEZIONE 1-RISULTATI SCIENTIFICI

1.INTRODUZIONE

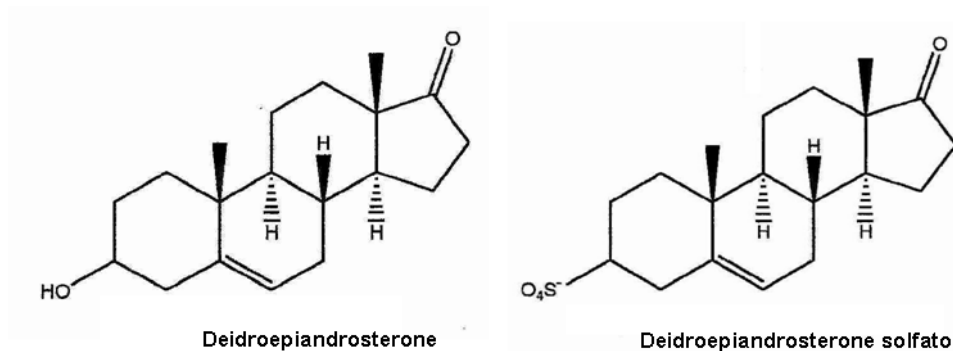
1.1 Deidroepiandrosterone

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è un ormone steroideo, precursore di ormoni quali estrogeni e androgeni (1). L'ormone adrenocorticotropo (ACTH), secreto dalla ghiandola ipofisaria (2), stimola la corteccia del surrene a produrre DHEA a partire dal colesterolo.

La sintesi del DHEA avviene in 3 distinte reazioni di cui due citocromo P450-dipendente. Nella prima reazione catalizzata dall'enzima 21-desmolasi il colesterolo viene idrossilato in posizione 21, originando pregnenolone. Successivamente l'enzima 17 α -idrossilasi catalizza la seconda reazione di idrossilazione che converte il pregnenolone in 17 α -idrossipregnenolone. Infine dall'azione di una liasi (C17,20 liasi) si forma il DHEA che può essere convertito in estrogeno o testosterone. Questa ultima trasformazione è dipendente da diversi fattori come 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) ed avviene principalmente nel surrene, ma anche nel fegato e nell'intestino (4). La forma solfata rappresenta una riserva di DHEA, consentendo di mantenerne i livelli stabili nell'arco della giornata ed ha emivita più lunga (7-10 ore contro 15-30 minuti del DHEA) dovuta ad una più ridotta eliminazione, mentre la frazione non solfata ha notevoli variazioni giornaliere (5). La concentrazione plasmatica di DHEA-S risulta massima intorno ai ventuno anni (3 µg/l), è costante per circa dieci anni, poi diminuisce rapidamente dopo i quaranta anni (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 utilizzato nella terapia di malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico (6) ed inibisce l'attività dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) spesso associata ad alcuni processi cancerogenici (2). Inoltre il DHEA è in grado di stimolare la dilatazione delle arterie coronarie in seguito alla sua conversione in estradiolo o in testosterone, due ormoni vasodilatatori, esercitando così un'azione cardioprotettiva (5), diminuisce l'adesione piastrinica alle cellule endoteliali, riducendo quindi il rischio d'insorgenza di placche aterosclerotiche. Ha un'azione antiaterogena (5) e accresce la risposta immunitaria ottimizzando l'effetto dei vaccini, potenziando in questo modo 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

Sebbene gli effetti del DHEA siano noti, i meccanismi d'azione attraverso cui agisce sono di difficile interpretazione. E' stato infatti dimostrato che il DHEA agisce sui vasi sanguigni attivando la ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), una famiglia di enzimi che produce ossido nitrico (NO) (13). In cellule endoteliali e in quelle derivanti dalla cresta neurale sembra 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). A contatto con cellule del tessuto osseo o della pelle invece il DHEA può esercitare la sua azione protettiva legandosi ai recettori degli estrogeni (ER) o degli androgeni (AR) (16,10). Questi studi suggeriscono quindi che il DHEA potrebbe agire grazie alla presenza di uno specifico recettore che attualmente non è ancora stato individuato (17).

Il principale meccanismo d'azione del DHEA si basa 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 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 cGMP 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).

1.3 Segnalazione piastrinica

Attivazione piastrinica

Numerosi agonisti fisiologici determinano l'attivazione e la conseguente cascata di trasduzione del segnale che porta a cambiamenti biochimici, morfologici e funzionali nella piastrina, culminando in un'aggregazione irreversibile. Tali processi richiedono una precisa coordinazione di molteplici vie di segnalazione all'interno della cellula che coinvolgono il metabolismo dei fosfolipidi di membrana, la mobilitazione del Ca^{2+} intracellulare, la traslocazione di proteine al citoscheletro actinico, la modulazione dell'avidità delle integrine e la fosforilazione di specifiche proteine su residui di serina, treonina e tirosina (20). L'attivazione o l'inibizione fisiologica della funzionalità piastrinica inizia quando una molecola segnale extracellulare interagisce con uno specifico recettore presente sulla membrana plasmatica. Nella segnalazione piastrinica un ruolo di fondamentale importanza è giocato dalle proteine G eterotrimeriche, dalle fosfolipasi C e A_2 e dalla fosfatidilinositolo 3-chinasi.

Le proteine G eterotrimeriche sono associate a recettori a sette domini transmembrana e sono composte da tre subunità di cui la subunità α contiene il sito di legame per il nucleotide guaninico ed è responsabile dell'interazione tra recettori ed effettori. L'eterodimero formato dalle subunità β e γ consente l'ancoraggio della proteina G alla membrana cellulare. L'attivazione dei canali ionici, l'inibizione dell'adenilato ciclasi e l'attivazione della fosfolipasi A_2 sono anch'esse mediate dall'eterodimero $\beta\gamma$. La subunità α è specifica, mentre il dimero $\beta\gamma$ è simile o identico in proteine differenti (21). Allo stato basale il GDP è strettamente legato alla subunità α . In seguito ad attivazione, il GDP si dissocia dal complesso, permettendo al GTP di legare la subunità α (22). Tale evento consente la dissociazione dell'eterodimero $\beta\gamma$ dalla subunità α portando all'attivazione, mediata dalla

subunità α legante GTP, dell'enzima che costituisce il secondo messaggero. L'attività GTPasica intrinseca della subunità α interrompe l'interazione tra GTP e subunità α stessa: la subunità α , legante ora GDP, si riassocia così all'eterodimero $\beta\gamma$ (21). Le piastrine contengono proteine G della famiglia G_i , G_q e G_{12} . I membri della famiglia G_q sono potenti attivatori della fosfolipasi C, i membri della famiglia G_i sono accoppiati all'adenilato ciclasi e la loro attivazione determina abbassamento dei livelli di cAMP.

La fosfolipasi C (PLC) è implicata nelle reazioni di secrezione delle piastrine. L'isoforma $PLC\beta$ è attivata dai dimeri $\beta\gamma$ delle proteine G eterotrimeriche, mentre la $PLC\gamma$ è attivata dalla fosforilazione delle sequenze ITAM da parte delle chinasi Syk, Src, Fyn. Le fosfolipasi catalizzano l'idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP_2) in diacilglicerolo (DAG) ed inositolo-1,4,5-trisfosfato (IP_3). Il diacilglicerolo attiva la protein chinasi C, regolando in ultimo il riarrangiamento del citoscheletro piastrinico, mentre l'inositolo-1,4,5-trisfosfato induce il rilascio del calcio dal sistema tubulare denso, provocando rilascio dai granuli di ADP e serotonina che potenziano l'attivazione e reclutano altre piastrine (21). La fosfolipasi A_2 (PLA_2) è invece responsabile del rilascio di acido arachidonico. La fonte predominante di acido arachidonico rilasciato dopo l'attivazione piastrinica deriva dall'idrolisi mediata dalla fosfolipasi A_2 dei fosfolipidi del sistema tubulare denso e della membrana plasmatica. PLA_2 idrolizza preferenzialmente la fosfatidilcolina, ma anche la fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e, in minor misura, fosfatidilinositolo (22). L'acido arachidonico è poi convertito in trombossano A_2 ad opera di una ciclossigenasi. La PLA_2 è attivata da un aumento del calcio citosolico dovuto alla sintesi di IP_3 indotta da PLC, ma probabilmente anche attraverso l'azione diretta da parte dell'eterodimero $\beta\gamma$ della proteina G (21).

Le fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3-K) sono una famiglia di chinasi che fosforilano in posizione 3 il fosfatidilinositolo, il fosfatidilinositolo-4-fosfato, il fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato per dare fosfatidilinositolo-3-fosfato, fosfatidilinositolo-3,4-bisfosfato ed il fosfatidilinositolo-3,4,5-trisfosfato. Le piastrine contengono due isoforme della PI3-K

costituite da una subunità adattatrice regolatoria (p85) che contiene due domini SH2 e un dominio SH3 e regola la localizzazione e la funzione della PI3-K e da una subunità catalitica (p110) (23). Nelle piastrine, la sintesi dei 3-fosfoinositidi è regolata in maniera complessa, attraverso meccanismi che coinvolgono le proteine G, la PKC, il reclutamento dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e l'aggregazione. I fosfoinositidi sono prodotti in risposta a vari agonisti tra cui trombina, ADP, trombossano A_2 . Un importante effettore a valle di PI3-K è la proteina Akt che viene attivata attraverso la proteina PDK che lega direttamente gli inositoli 3-fosfati. La proteina Akt può svolgere diversi ruoli nell'attivazione piastrinica (24).

Ruolo delle tirosin chinasi

La fosforilazione in tirosina di proteine è importante ai fini dell'attivazione piastrinica. Tale processo è dinamico e reversibile e risulta regolato dall'attivazione e dalla redistribuzione subcellulare di tirosin chinasi e fosfatasi citosoliche (25). La maggioranza delle tirosin chinasi identificate nelle piastrine appartiene alle forme citosoliche non recettoriali e comprende i membri delle famiglie di Src, FAK, Syk e JAK. Queste ultime hanno la funzione di mantenere un basso livello di fosfotirosine all'interno di una cellula a riposo prevenendo una prematura attivazione piastrinica. In seguito alla stimolazione con diversi agonisti, come trombina e collagene, si assiste ad un forte incremento nel livello di fosforilazione in tirosina di molteplici proteine, suggerendo che questi eventi rappresentino una caratteristica generale dell'attivazione piastrinica. La stimolazione di numerosi recettori, inoltre, porta ad un rapido aumento dell'attività enzimatica di una famiglia di serin-treonin chinasi conosciute come MAPKs. Queste chinasi sono in grado di convertire gli stimoli extracellulari in segnali intracellulari che controllano l'espressione genica, la proliferazione, il differenziamento cellulare e l'apoptosi. Le MAPKs sono state classificate in tre sottofamiglie: le chinasi ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), le chinasi JNK/SAPK (c-Jun N-terminal or Stress-

Activated Kinase) e la p38 MAP chinasi (26). In seguito all'attivazione le MAPKs trasducono il segnale fosforilando i loro substrati a valle, su residui di treonina e serina adiacenti a residui di prolina (27). Esse sono espresse in modo ubiquitario in tutti i tessuti. Le piastrine contengono diversi membri della famiglia delle MAP chinasi: ERK1 (p44), ERK2 (p42), alcune isoforme della p38 e JNK1 (28).

1.4 Inibizione piastrinica

In condizioni fisiologiche le piastrine si trovano in uno stato inattivo grazie a fattori rilasciati dalle cellule endoteliali della parete vasale, tra cui le prostaglandine (PGE1, PGI2) e il monossido d'azoto (NO) (29).

PGE1 e PGI2 legano il proprio recettore accoppiato a proteine G consentendo alla subunità $G_{\alpha s}$ di attivare l'adenilato ciclasi (AC) aumentando i livelli di cAMP intracellulari. L'ossido nitrico invece stimola direttamente la guanilato ciclasi intracellulare causando un aumento della concentrazione intracellulare di cGMP. I nucleotidi ciclici così prodotti attivano proteine chinasi cGMP e cAMP-dipendenti (PKG e PKA) (30) e le fosfodiesterasi (PDE). Queste ultime controllano i livelli dei nucleotidi ciclici stessi monitorando quindi i segnali inibitori (31). La PKA e la PKG attivate invece determinando la fosforilazione di una molte di proteine (32) e l'inibizione di pathways attivatori. È stato infatti osservato che l'aumento di nucleotidi ciclici causa un'inibizione della PLC, con un meccanismo non del tutto chiarito che porta ad un blocco nel rilascio del calcio dal sistema tubulare denso, agendo probabilmente sul recettore dell'IP3 (33). Inoltre l'attivazione di PKA e PKG causa l'inibizione della secrezione dei granuli piastrinici, bloccando quindi il rilascio di fattori procoagulanti nel sangue e l'esposizione di $\alpha_{IIb}\beta_3$ e di molecole proinfiammatorie, quali P-selectina e CD40-ligand, dagli stores intracellulari alla superficie piastrinica (34). L'aumento di cAMP e cGMP porta anche all'inibizione delle MAP chinasi p38 e p42, entrambe importanti per l'attivazione piastrinica

(34). Una delle più importanti azioni mediate dalle due protein chinasi è la fosforilazione di diversi substrati tra cui: ABP, proteina coinvolta nello stabilizzare i filamenti di actina (35), GPIb, subunità del recettore per il fattore di vonWillebrand (36), Hsp27, proteina anch'essa coinvolta nella polimerizzazione dell'actina (37), Rap1b, piccola GTPasi coinvolta nell'adesione cellulare (38) e VASP.

VASP (Vasodilator-stimulated protein) è una proteina di 46 kDa che si trova associata alla membrana piastrinica dove gioca un ruolo importante nel controllo dell'organizzazione del citoscheletro e della polimerizzazione dell'actina. Essa infatti si trova localizzata a livello di stress fibers, adesioni focali e giunzioni cellula-cellula (39). In risposta agli antagonisti piastrinici, NO e PGI₂, VASP è substrato sia di PKA che di PKG (32). La sua fosforilazione è correlata all'inibizione piastrinica in quanto porta ad una diminuzione della sua affinità per l'F-actina. Sono stati individuati tre diversi siti di fosforilazione di VASP: la Serina 157, la Serina 239 e la Treonina 278. La fosforilazione della Serina 157 determina uno shift della mobilità elettroforetica di VASP in SDS-PAGE da 46 kDa a 50 kDa (40; 41) ed è dovuta dall'azione preferenziale della PKA. La fosforilazione in Serina 239 è invece dovuta prevalentemente all'azione della PKG.

2. SCOPO DEL LAVORO

Il deidroepiandrosterone (DHEA) 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 i livelli stabili nell'arco della giornata ed ha un'emivita più lunga per via di una ridotta eliminazione (5). La concentrazione plasmatica di DHEA (e DHEA-S) decresce nel corso della vita (2); infatti sono attribuiti a questo ormone effetti protettivi verso l'insorgenza di malattie tipiche dell'anziano, quali per esempio l'aterosclerosi.

Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il DHEA-S inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina e la fosforilazione di proteine essenziali ai fini della funzionalità piastrinica. Tuttavia il meccanismo attraverso cui il DHEA-S agisce inibendo le piastrine non era del tutto caratterizzato.

A tale scopo durante questo primo anno di dottorato ho valutato quale fosse l'effetto del DHEA-S sull'attivazione di proteine e sul rilascio del contenuto dei granuli densi piastrinici, eventi di fondamentale importanza ai fini dell'attivazione e dell'aggregazione piastrinica.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

La membrana per il trasferimento Hybond-P polyvinylidene difluoride (PVDF) è stata acquistata dalla Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Gli anticorpi policlonali anti-fosfo-Akt (Ser⁴⁷³), anti-fosfo-p44/42 MAP chinasi (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) e anti-fosfo-p38MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr⁸¹²), anti-integrina β 3 forniti dalla Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Reagenti CHRONO-LUME forniti dalla CHRONO-LOG Corporation (Havertown, PA). Anticorpo policlonale anti-Src chinasi (Tyr⁴¹⁸), trombina, ADP, apirasi, deidroepiandrosterone 3-solfato (DHEA-S), 3- β -Hydroxy-5-androsten-17-on (DHEA), forniti dalla Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO).

3.2 Isolamento delle piastrine

I campioni di sangue sono stati raccolti da volontari sani che non avevano assunto farmaci nei dieci giorni antecedenti la donazione. Il prelievo è stato effettuato usando come anticoagulante l'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 stati centrifugati a 120 x g per 10 minuti a temperatura ambiente in modo da separare il plasma ricco in piastrine (PRP) dagli altri elementi del sangue. Il PRP è stato quindi raccolto e centrifugato a 300 x g per 10 minuti a temperatura ambiente per separare il plasma povero in piastrine (PPP), che è stato eliminato, dal pellet piastrinico che è stato successivamente risospeso in ACD. Le piastrine sono state poi purificate mediante gel-filtrazione su colonna di Sepharose 2B equilibrata in Tyrode a pH 7,4 (10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃). Le piastrine ottenute sono state contate al microscopio ottico su camera di Burker e portate alla concentrazione desiderata in Tyrode.

3.3 Analisi dell'aggregazione piastrinica

L'aggregazione piastrinica è stata seguita utilizzando un aggregometro Chrono Log modello 560CA. Le piastrine sono state portate alla concentrazione di 3×10^8 /ml e addizionate di glucosio (5,5 mM), CaCl_2 (2 mM) e MgCl_2 (2 mM). Campioni da 250 μl sono stati preincubati per 1 minuto con DHEA (10 nM) o con DHEA-S (0,3 mM) a 37° C sotto agitazione magnetica costante e successivamente stimolati con trombina (0,05 U/ml), da sola o in associazione con ADP (10 μM), con collagene (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e con un analogo del Trombossano A₂, U46,619 (1 μM). L'aggregazione è stata monitorata per almeno 5 minuti. In alcuni esperimenti le piastrine sono state trattate con apirasi (5 U/ml) e CP/CPK (5 mM per il CP e 40 U/ml per CPK), prima dello stimolo con DHEA-S.

3.4 Elettroforesi ed immunoblotting

Piastrine gel-filtrate sono state portate alla concentrazione di 3×10^8 /ml, poste a 37° C sotto agitazione magnetica costante e trattate con DHEA-S (0,3 mM) o metanolo (0.3%) come controllo per 1 minuto e successivamente trattate con trombina (0.05 U/ml) per 5 minuti da sola o in associazione con ADP (10 μM). Sono state poi lisate in ghiaccio con Laemmly 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 stati caricati su gel di poliacrilammide e le proteine sono state separate in SDS-PAGE, trasferite su membrana PVDF e analizzate mediante immunoblotting utilizzando anticorpi anti-p-Akt (Ser⁴⁷³), anti-p-p44/42ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), anti-p-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), anti-p-Src chinasi Tyr⁴¹⁸ e anti-integrina $\beta 3$.

RISULTATI E DISCUSSIONE

4. RISULTATI

Effetto del DHEA-S sull'attivazione piastrinica

Negli anni precedenti nel nostro laboratorio è stato dimostrato che il DHEA-S, forma di riserva dell'ormone, ma non il DHEA, forma attiva, inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina senza coinvolgere il recettore degli estrogeni (Fig. 1A) con un meccanismo non ancora identificato. Per meglio indagare la cinetica dell'inibizione causata dal DHEA-S sull'aggregazione, campioni di piastrine sono stati pre-incubati con differenti concentrazioni di DHEA-S (da 0.075 mM a 1 mM) per 1 minuto e successivamente stimolate con diverse dosi di trombina, 0.025 U/ml e 0.05 U/ml. L'inibizione promossa dal DHEA-S è risultata essere dose-dipendente: l'effetto è massimo a concentrazioni maggiori di 0.5 mM, che causano una completa inibizione dell'aggregazione indotta da entrambe le dosi di trombina utilizzate (fig. 1D).

L'aggregazione piastrinica può essere attivata da vari agonisti che attivano vie multiple di segnalazione che possono essere divise in eventi comuni a tutti gli agonisti ed in eventi specifici legati a classi di recettori, come i recettori accoppiati a proteine G, integrine e recettori legati alle sequenze ITAM. Per verificare se il DHEA-S fosse in grado di inibire solo l'aggregazione indotta da trombina, campioni di piastrine gel-filtrate sono stati pre-incubati con DHEA-S (0.3 mM) e Metanolo (0.3%) come controllo per 1 minuto e successivamente stimolate con collagene (2 µg/ml), che attiva recettori legati alle sequenze ITAM ed integrine, e con un analogo del trombossano A₂, l'U46,619 (1 µM), che segnala attraverso recettori accoppiati a proteine G, nel caso specifico G_q-G_{12/13} come la trombina. Abbiamo visto che il DHEA-S, ma non il DHEA, è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta da entrambi gli agonisti (fig. 1B e 1C).

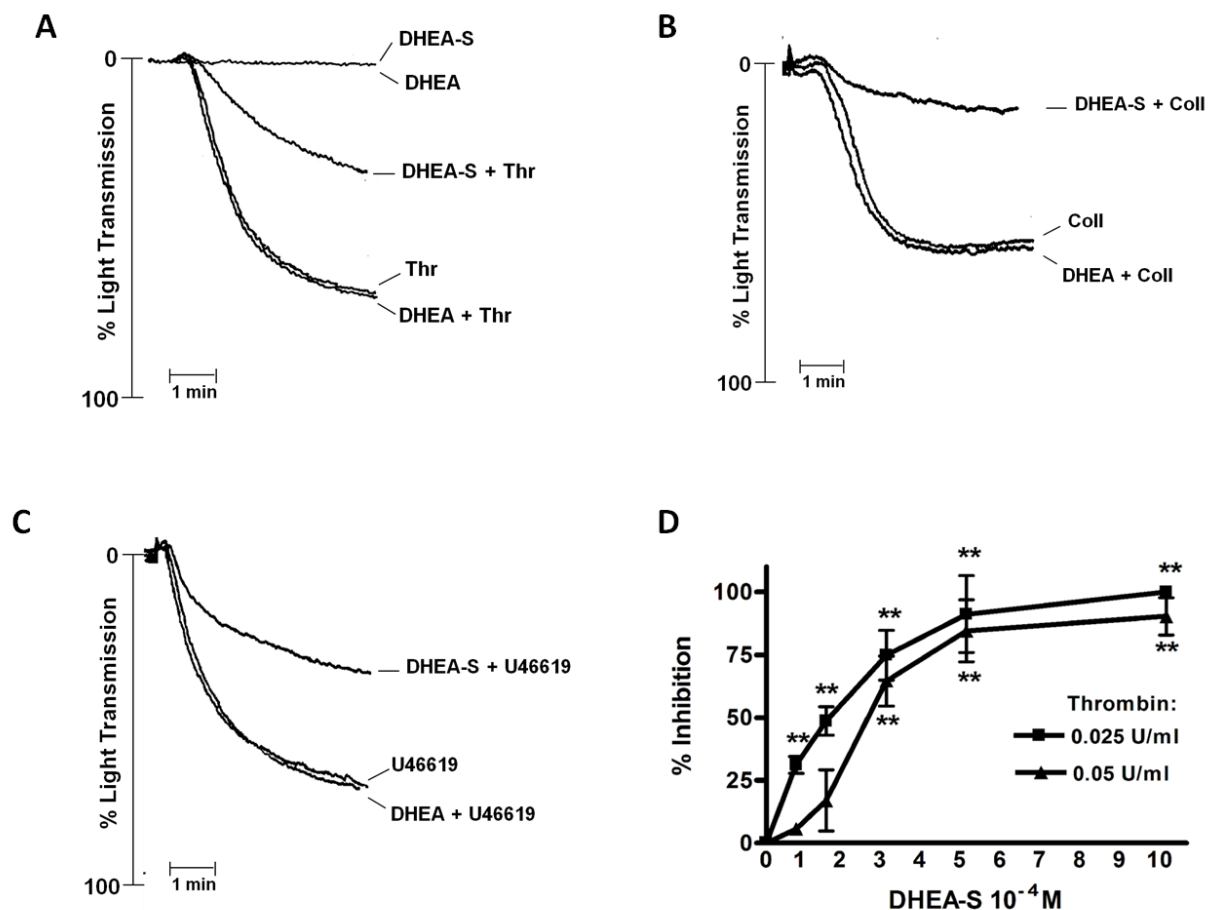


Fig. 1

Effetto del DHEA-S e del DHEA sull'aggregazione piastrinica. Campioni di piastrine gel-filtrate 3×10^8 /ml sono stati pretrattati con Metanolo (V), 0.3 mM di DHEA-S, 10 nM di DHEA per 1 minuto, e successivamente stimolati con 0.05 U/ml di trombina (A), 2 μ g/ml di collagene (B) e 1 μ M di U46,619 (C) per 5 minuti. Le figure mostrano i tracciati di aggregazione di un esperimento rappresentativo di 3 condotti su piastrine ottenute da diversi donatori.

Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono stati pretrattati con Metanolo (V), 0.3 mM DHEA-S per 1 minuto, e successivamente stimolati con differenti concentrazioni di trombina (0.025 U/ml e 0.05 U/ml) (D). (Significatività statistica calcolata con One Way Anova con test post-hoc di Bonferroni; ** $p < 0.01$)

Il DHEA-S inibisce la secrezione del contenuto dei granuli densi

Gli agonisti piastrinici, e in particolare agonisti forti come la trombina, sono in grado di attivare cascate di segnalazione che portano all'attivazione mediante fosforilazione di alcune chinasi come Src (33), le MAP chinasi ERK 1/2 (34), p38 MAPK (35) e Akt (36), importanti nel rilascio del contenuto dei granuli densi (ADP) e per potenziare dell'aggregazione (37).

Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio non sono stati in grado di chiarire attraverso quale meccanismo il DHEA-S agisse nell'inibire l'aggregazione piastrinica. Abbiamo quindi ipotizzato che il DHEA-S potesse agire sulle piastrine inibendo selettivamente il rilascio del contenuto dei granuli densi.

Per confermare questa ipotesi piastrine gel-filtrate sono state pre-incubate con DHEA-S (0.3 mM) e Metanolo (0.3%) come controllo per 1 minuto e successivamente indotte ad aggregare con trombina (0.05 U/ml) e con ADP (10 μ M) in associazione.

I nostri dati hanno mostrato che l'aggiunta di ADP è in grado di revertire l'effetto inibitorio del DHEA-S sull'aggregazione indotta da trombina (fig.2)

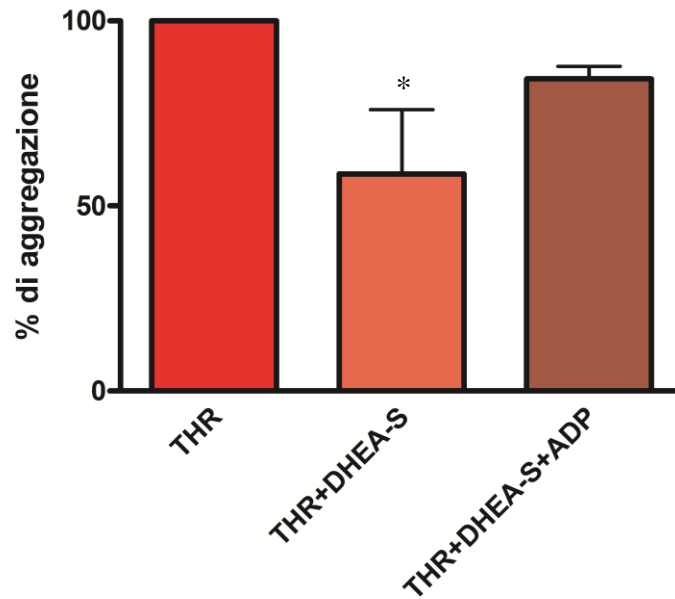


Fig. 2

L'ADP reverte l'effetto del DHEA-S sull'aggregazione. Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono stati pretrattati con solvente o 0.3 mM di DHEA-S per 1 minuto e stimolati con 0.05 U/ml di trombina da sola o in associazione con 10 μ M di ADP. I risultati sono espressi come % di aggregazione rispetto al controllo (THR=100%). I dati riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. (* $p < 0.01$ vs THR)

Le stesse piastrine usate in aggregazione sono state successivamente lisate con Laemmli Buffer addizionato di inibitori e analizzate in immunoblotting con gli anticorpi specifici per le forme fosforilate di Akt e ERK1/2 e con l'anticorpo $\beta 3$.

I nostri risultati hanno dimostrato che il DHEA-S è in grado di inibire la fosforilazione indotta da trombina delle proteine analizzate. Tuttavia l'aggiunta di ADP esogeno è in grado di ripristinare il pattern di fosforilazione riscontrato nel campione trattato con la sola trombina (fig.3).

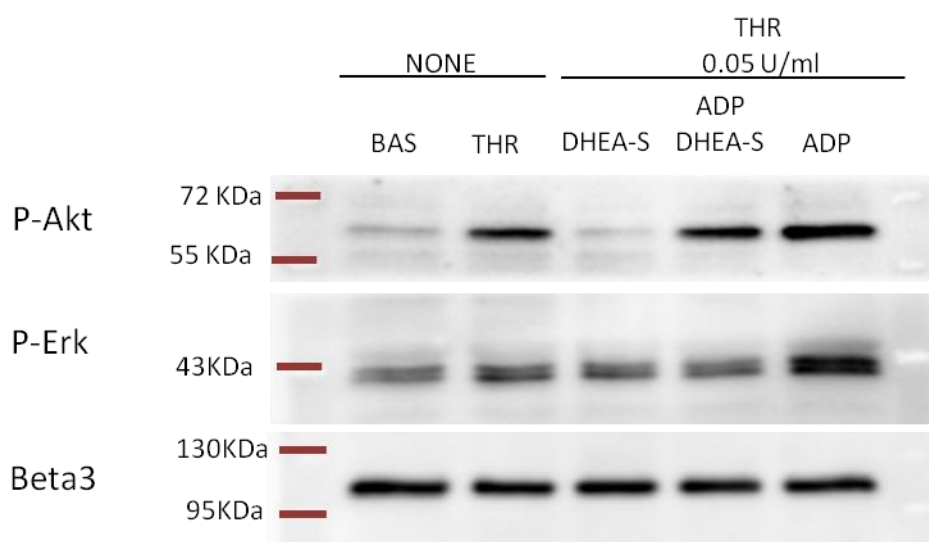


Fig. 3

L'ADP reverte l'effetto del DHEA-S sull'inibizione della fosforilazione proteica. Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono stati pretrattati con solvente (BAS), $0.3 \mu\text{M}$ di DHEA-S per 1 minuto e successivamente stimolati con 0.05 U/ml di trombina da sola o in associazione con ADP ($10 \mu\text{M}$) per 5 minuti. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici. In figura è riportato un esperimento rappresentativo di 3 condotti su piastrine di diversi donatori.

Per valutare se l'effetto del DHEA-S sull'inibizione piastrinica fosse dovuto ad un coinvolgimento dell'ADP, piastrine gel-filtrate sono state pre-incubate con DHEA-S (0.3 mM), Metanolo (0.3%) e con CP/CPK (5 mM per il CP e 40 U/ml per il CPK), una chinasi che è in grado di degradare tutto l'ADP secreto dalle piastrine, ed indotte ad aggregare con trombina (0.05 U/ml) e ADP (10 μ M) in associazione. Successivamente le piastrine sono state lisate in ghiaccio con Laemmli Buffer 3x addizionato di inibitori e analizzate in immunoblotting con gli anticorpi specifici per le forme fosforilate di Akt e ERK1/2 e con l'anticorpo β 3. (Fig. 4A e 4B).

I nostri dati hanno mostrato che il trattamento con CP/CPK inibisce totalmente l'aggregazione piastrinica indotta da trombina, sia in presenza di DHEA-S che in presenza di ADP esogeno, questo ad indicare che l'inibizione esplicita dal DHEA-S sul rilascio del contenuto dei granuli densi è parziale e non totale.

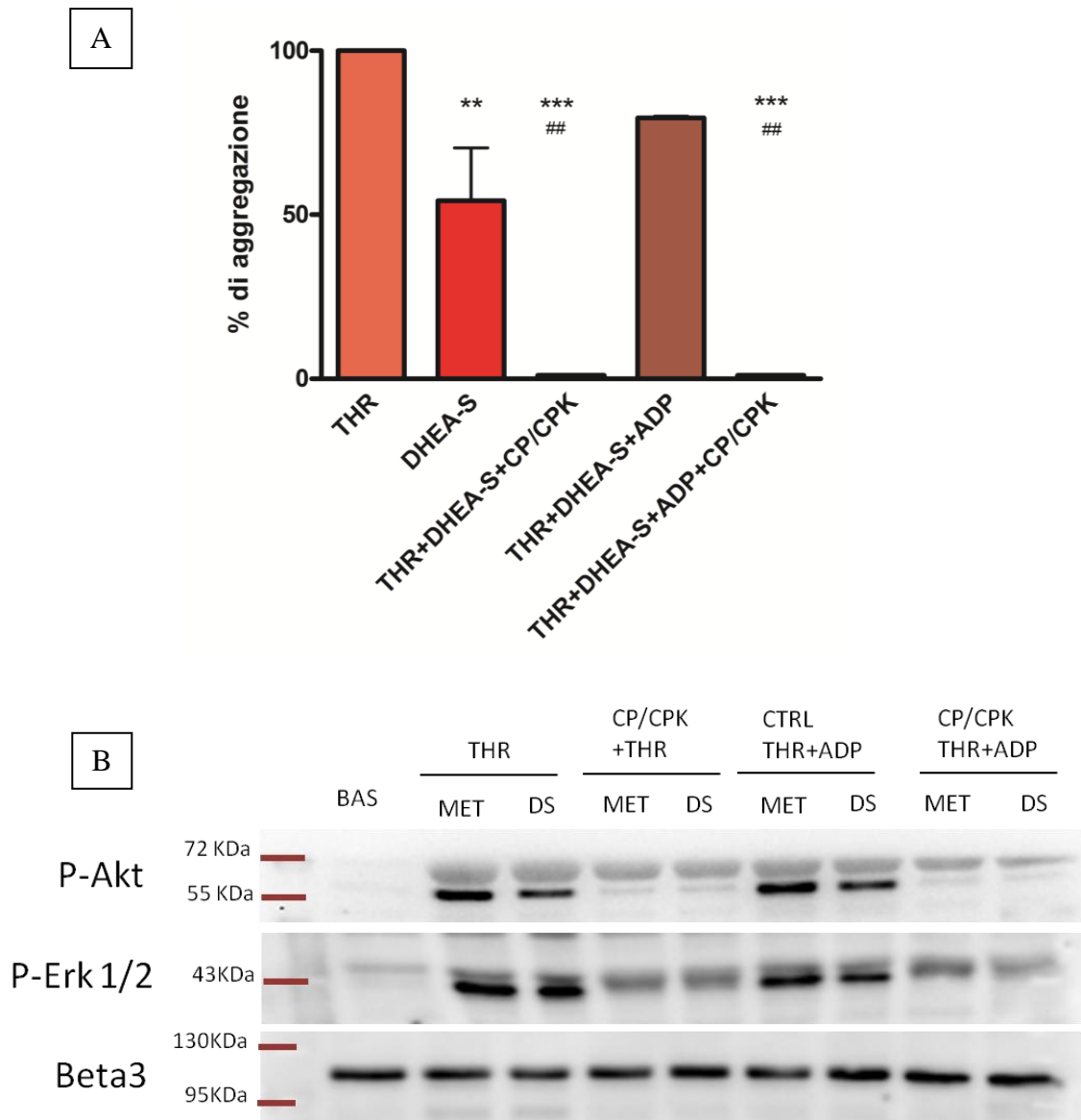


Fig 4

(A) Effetto del trattamento con CP/CPK sull'aggregazione piastrinica.

Campioni di piastrine gel filtrate concentrate 3×10^8 /ml vengono pretrattati con solvente, DHEA-S (0.3 mM) o CP/CPK (5 mM CP e 40 U/ml CPK) per 1 minuto e stimolati con trombina (0,05 U/ml) da sola o in associazione con ADP (10 μ M). I risultati sono espressi come % di aggregazione piastrinica rispetto al controllo, la quale è stata posta arbitrariamente uguale a 100. I dati riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparato al controllo; ## $p < 0,05$ comparato al DHEA-S).

(B) Il DHEA-S riduce la fosforilazione di Akt e P-Erk 1/2. Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono stati pretrattati con solvente (BAS), DHEA-S (0.3 μ M) o CP/CPK (5 mM CP e 40 U/ml CPK) per 1 minuto e successivamente stimolati con 0.05 U/ml di trombina sola o in associazione con ADP (10 μ M) per 5 minuti. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici. In figura è riportato un esperimento rappresentativo di 3 condotti su piastrine di diversi donatori.

5. DISCUSSIONE

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è un ormone steroideo, precursore di ormoni quali estrogeni e androgeni (1). L'ormone adrenocorticotropo (ACTH), secreto dalla ghiandola ipofisaria (2), stimola la corteccia del surrene a produrre DHEA a partire dal colesterolo.

La sua concentrazione diminuisce con il trascorrere del tempo a partire dai trent'anni e questo decremento viene associato ad un aumento nella suscettibilità di insorgenza di malattie tipiche dell'età avanzata come aterosclerosi (5).

Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il DHEA-S inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina e la fosforilazione di proteine essenziali ai fini della funzionalità piastrinica. Tuttavia il meccanismo attraverso cui il DHEA-S agisse inibendo le piastrine non era del tutto caratterizzato.

A tale scopo durante questo primo anno di dottorato ho valutato quale fosse l'effetto del DHEA-S sull'attivazione di proteine e sul rilascio del contenuto dei granuli densi piastrinici, eventi di fondamentale importanza ai fini dell'attivazione e dell'aggregazione piastrinica.

L'aggregazione piastrinica può essere attivata da vari agonisti che attivano vie multiple di segnalazione che possono essere divise in eventi comuni a tutti gli agonisti ed in eventi specifici legati a classi di recettori, come i recettori accoppiati a proteine G, integrine e recettori associati alle sequenze ITAM. Ho quindi verificato se il DHEA-S potesse inibire l'aggregazione piastrinica indotta da agonisti diversi dalla trombina, come il collagene e un analogo del Trombossano A₂, l'U46,619. I risultati che ho ottenuto mostrano che il DHEA-S è in grado di inibire l'aggregazione indotta da tali agonisti, portandomi alla conclusione che il DHEA-S agisca inibendo una via di segnalazione comune a tutti gli agonisti.

In seguito a questi risultati mi sono chiesta se l'evento coinvolto nell'azione inibitoria del DHEA-S sulle piastrine fosse quello della secrezione dei granuli densi, importante per l'amplificazione della risposta piastrinica e per la formazione di un trombo stabile. Ho quindi

valutato quale fosse l'effetto del DHEA-S sull'aggregazione piastrinica indotta da trombina in presenza di ADP esogeno. I nostri risultati hanno mostrato che l'aggiunta di ADP è in grado di revertire l'effetto inibitorio del DHEA-S.

Sono andata inoltre a valutare i livelli di fosforilazione delle più importanti chinasi coinvolte nella via secretoria come Akt e la MAP chinasi ERK 1/2. I nostri risultati hanno dimostrato che il DHEA-S è in grado di inibire la fosforilazione indotta da trombina delle proteine analizzate. Tuttavia l'aggiunta di ADP esogeno è in grado di ripristinare il pattern di fosforilazione riscontrato nel campione di controllo, suggerendo che il DHEA-S agisce sulle piastrine inibendo la cascata di segnalazione che porta alla secrezione del contenuto dei granuli densi.

Per verificare quest'ipotesi ho eseguito esperimenti in aggregometria trattando le piastrine con DHEA-S e con CP/CPK, una chinasi in grado di degradare l'ADP secreto dalle piastrine. Successivamente le piastrine sono state indotte ad aggregare con trombina sola o in associazione all'ADP. I nostri dati hanno dimostrato che il trattamento con CP/CPK inibisce completamente l'aggregazione piastrinica anche in presenza di DHEA-S.

Successivamente ho analizzato i profili di fosforilazione delle chinasi della via secretoria, confermando i dati precedentemente ottenuti in aggregazione.

In conclusione questi dati indicano che il DHEA-S è in grado di inibire la secrezione dei granuli densi, ma solo parzialmente, suggerendo quindi che esso possa agire sulle piastrine mantenendole in uno stato resting, agendo attraverso vie multiple di segnalazione.

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, R.F., Engleman, E.G., McGuire, J.L., (1994) *Arthritis Rheum.* 37(9):1305-10.
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, JL., Higgins, KA., Corbin, JD., Francis, SH., (2006) *J Biol Chem*. 281:6977-84.
20. Jackson, S.P., Schoenwaelder, S.M., Yuan, Y., Salem, H.H., Cooray, P., (1996) *Thromb Haemost.* 76(5):640-50.
21. Blockmans, D., Deckmyn, H., Vermynen, J., (1995) *Blood Rev.* 9(3):143-56.
22. Kroll, M.H., Schafer, A.I., (1989) *Blood*. 74(4):1181-95.
23. Zhang, J., Banfić, H., Straforini, F., Tosi, L., Volinia, S., Rittenhouse, S.E., (1998) *J Biol Chem*. 5;273(23):14081-4.
24. Kroner, C., Eybrechts, K., Akkerman, J.W., (2000) *J Biol Chem*. 8;275(36):27790-8.
25. Diaz-Ricart, M., Palomo, M., Fuste, B., Lopez-Vilchez, I., Carbo, C., Perez-Pujol, S., White, J.G., Escolar, G., (2008) *Thromb Res*. 121(6):873-83.
26. Lopez-Illasaca, M., (1998) *Biochem Pharmacol*. 1;56(3):269-77.
27. New, L., Han, J., (1998) *Trends Cardiovasc Med*. 8(5):220-8.
28. Bugaud, F., Nadal-Wollbold, F., Lévy-Toledano, S., Rosa, J.P., Bryckaert, M., (1999) *Blood*. 1;94(11):3800-5.
29. Schwarz, U.R., Walter, U., Eigenthaler, M., (2001) *Biochem Pharmacol*. 1;62(9):1153-61.
30. Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U., De Jonge, H.R., (1997) *Trends Biochem Sci*. 22(8):307-12.
31. Soderling, S.H., Beavo, J.A., (2000) *Curr Opin Cell Biol*. 12(2):174-9.

32. Walter, U., Eigenthaler, M., Geiger, J., Reinhard, M., (1993) *Adv Exp Med Biol.* 344:237-49.
33. Cavallini, L., Coassin, M., Borean, A., Alexandre, A., (1996) *J Biol Chem.* 271(10):5545-51.
34. Schwarz, U.R., Kobsar, A.L., Kokschi, M., Walter, U., Eigenthaler, M., (2000) *Biochem Pharmacol.* 60(9):1399-407.
35. Chen, M., Stracher, A., (1989) *J Biol Chem.* 264(24):14282-9.
36. Fox, J.E., Berndt, M.C., (1989) *J Biol Chem.* 264(16):9520-6.
37. Butt, E., Immler, D., Meyer, H.E., Kotlyarov, A., Laass, K., Gaestel, M., (2001) *J Biol Chem.* 276(10):7108-13.
38. Siess, W., Winegar, D.A., Lapetina, E.G., (1990) *Biochem Biophys Res Commun.* 170(2):944-50.
39. Eigenthaler, M., Nolte, C., Halbrügge, M., Walter, U., (1992) *Eur J Biochem.* 205(2):471-81.
40. Halbrügge, M., Walter, U., (1989) *Eur J Biochem.* 185(1):41-50.
41. Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J., Walter, U., (1994) *J Biol Chem.* 269(20):14509-17.
42. Hellevuo, K., Yoshimura, M., Mons, N., Hoffman, P.L., Cooper, D.M., Tabakoff, B., (1995) *J Biol Chem.* 270(19):11581-9.
43. Jin, J., Kunapuli, S.P., (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8070-4.
44. Hellevuo, K., Welborn, R., Menninger, J.A., Tabakoff, B., (1997) *Am J Med Genet.* 74:95-8.
45. Zieve, P.D., Greenough, W.B. 3rd., (1969) *Biochem Biophys Res Commun.* 35(4):462-6.
46. Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Hönig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H., Walter, U., (1998) *J Biol Chem.* 273:20029-35.

47. Lawrence, DW., Pryzwansky, KB., (2001) *J Immunol* 166:5550-6.
48. Jensen, BO., Selheim, F., Døskeland, SO., Gear, AR., Holmsen, H., (2004) *Blood* 104:2775-82.
49. Holinstat, M., Voss, B., Bilodeau, ML., McLaughlin, JN., Cleator, J., Hamm, HE., (2006) *J Biol Chem* 281(36):26665-74.
50. Bernardi, B., Guidetti, GF., Campus, F., Crittenden, JR., Graybiel, AM., Balduini, C., Torti, M., (2006) *Blood* 107:2728-35.
51. Lova, P., Campus, F., Lombardi, R., Cattaneo, M., Sinigaglia, F., Balduini, C., Torti, M., (2004) *J Biol Chem* 279:25299-306.
52. Coughlin, SR., (2005) *J Thromb Haemost* 3:1800-14.
53. Chen, X., Earley, K., Luo, W., Lin, S.H., Schilling, W.P., (1996) *Biochem J.* 314 (Pt 2):603-11.
54. Böhm, SK., Khitin, LM., Grady, EF., Aponte, G., Payan, DG., Bunnett, NWJ., (1996) *Biol Chem.* 271:22003-16.
55. Golden, A., Brugge, J.S., (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(3):901-5.
56. Kramer, R.M., Roberts, E.F., Strifler, B.A., Johnstone, E.M., (1995) *J Biol Chem.* 270(46):27395-8..
57. Papkoff, J., Chen, R.H., Blenis, J., Forsman, J., (1994) *Mol Cell Biol.* 14(1):463-72.
58. Kroner, C., Eybrechts, K., Akkerman, J.W., (2000) *J Biol Chem.* 275(36):27790-8.
59. Adam, F., Kauskot, A., Rosa, J.P., Bryckaert, M., (2008) *J Thromb Haemost.* 6(12):2007-16.
60. Harper, M.T., Poole, A.W., (2007) *Biochem Soc Trans.* 35(Pt 5):1005-8.

ATTIVITA' FORMATIVA

AA 2010-2011

Biom mineralization and preparation of biomimetic nanoapatites

Dr. J.G. Morales

11/11/10

Le cellule NK: dalla biologia alla terapia di leucemie ad alto rischio

Prof. L. Moretta

29/11/10

Linfomi cutanei primitivi

Prof. E. Berti

02/03/11

Ferritins: ancient proteins with novel unexpected features

Dr.ssa S. Levi

12/04/11

Metabolic syndrome: the gastroenterologist point of view

Prof.ssa E. Bugianesi

13/04/11

Liver fibrosis in children affected by NASH: how to investigate that

Prof. V. Nobili

29/04/11

Reverse vaccination in autoimmune diseases

Prof. G. Filaci

03/05/11

Innate immunity and the pathogenicity of inhaled microbial particles

Prof. H. Wolff

09/05/11

Farmacologia dell'aterosclerosi

Prof. A. Corsini

13/05/11

Ion torrent technology for massive parallel sequencing

Dott. A. Di Nicola

23/05/11

Iron management in the hepcidin Era

Dr. S.R. Ellis

25/05/11

Molecular pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease

Prof. M. Fasano

17/06/11

Importance of pathobiology in rheumatoid arthritis

Prof. Pitzalis

24/06/11

Genetics and clinical phenotypes of Frontotemporal lobar degeneration

Dr. J. Rohrer

24/06/11

Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis

Prof. M. Parola

01/07/11

ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA

Lezioni frontali (Prof. Albano, Dott.ssa Corrado, Dr. Comi) interne al dipartimento

Journal Club interni al dipartimento

SEZIONE 2:

PARTECIPAZIONI A CONGRESSI:

Simposio in onore di Jacopo Meldolesi: “Intracellular signalling, calcium ions and membrane trafficking”

Milano, Istituto Scientifico San Raffaele, 30 marzo 2011

Convegno annuale della sezione ligure – lombardo – piemontese della Societa' Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare (LLP 2011)

Novara, 21 maggio 2011

36th FEBS Congress

Torino, 25-30 giugno 2011

13th UK Platelet Group Meeting

Cardiff, United Kingdom, 8-9 Settembre 2011

COMUNICAZIONI A CONGRESSI :

Comunicazioni presentate personalmente:

13th UK Platelet Group Meeting

Cardiff, United Kingdom, 8-9 Settembre 2011

“Dehydroepiandrosterone-Sulfate Inhibits Platelet Aggregation By Selectively Modulating Dense Granule Release”

Alessandra Bertoni^{1,2}, Clara Di Vito¹, **Michela Nalin**¹, Sara Sampietro¹, Alessandro Rastoldo¹ & Fabiola Sinigaglia^{1,2} (poster)

Altre comunicazioni:

36th FEBS Congress

Torino, 25-30 giugno 2011

“8-Prenylarnigenin, A Novel Inhibitor Of Platelet Aggregation”

C. Di Vito¹, S. Sampietro¹, **M. Nalin**¹, A. Bertoni^{1,2}, F. Sinigaglia^{1,2} (poster)

“Preliminary analysis of the role of diacylglycerol kinase alpha in megakaryopoiesis and platelet function”

S. Sampietro, C. Di Vito, **M. Nalin**, X.P. Zhong, A. Graziani, F. Sinigaglia, A. Bertoni (poster)

13th UK Platelet Group Meeting

Cardiff, United Kingdom, 8-9 Settembre 2011

“8-Prenylarnigenin, A New Actor In Platelet Inhibition”

Clara Di Vito¹, Sara Sampietro¹, **Michela Nalin**¹, Alessandra Bertoni^{1,2} & Fabiola Sinigaglia^{1,2} (poster)

“Diacylglycerol kinase alpha: a new regulator of megakaryopoiesis and platelet function”

S. Sampietro, C. Di Vito, **M. Nalin**, X.P. Zhong, A. Graziani, F. Sinigaglia, A. Bertoni (poster)

ARTICOLI SCIENTIFICI PRODOTTI NEL CORSO DEL DOTTORATO:

“ DEHYDROEPIANDROSTERONE-SULFATE INHIBITS THROMBIN-INDUCED PLATELET AGGREGATION”

Alessandra Bertoni, Alessandro Rastoldo, Chiara Sarasso, Clara Di Vito, Sara Sampietro, **Michela Nalin**, Alessandra Bagarotti, Fabiola Sinigaglia (IN SOTTOMISSIONE)

"THE PHYTO-OESTROGEN 8-PRENYLNARINGENIN INHIBITS AGONIST-DEPENDENT ACTIVATION OF HUMAN PLATELETS"

Di Vito, Clara; Bertoni, Alessandra; Zanfa, Manuela; Sampietro, Sara; Rastoldo, Alessandro; **Nalin, Michela**; Sinigaglia, Fabiola (IN SOTTOMISSIONE)