

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JÉSSICA OLIVEIRA FRADE GUANAES

ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DAS ISOFORMAS ε-PKC E δ-PKC NA DIMINUIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA NA SEPSE EXPERIMENTAL

Campinas 2016

JÉSSICA OLIVEIRA FRADE GUANAES

ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DAS ISOFORMAS ε-PKC E δ-PKC NA DIMINUIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA NA SEPSE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA JÉSSICA OLIVEIRA FRADE GUANAES, E ORIENTADA PELA PROF. DR. SISI MARCONDES PASCHOAL.

> Campinas 2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-3488/2014; CAPES, 01-P-4348/2015; CAPES, 01-T-1748/2016

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Frade-Guanes, Jéssica Oliveira, 1992-

F841e Estudo do envolvimento das isoformas epsilon-PKC e delta-PKC na diminuição da agregação plaquetária na sepse experimental / Jéssica Oliveira Frade Guanaes. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Sisi Marcondes Paschoal.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Plaquetas. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Proteína quinase C. 4. Proteína quinase B. 5. Proteína quinase G

. I. Paschoal, Sisi Marcondes,1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Titulo em outro idioma: Study of involvement of epsilon-PKC and delta-pkc isoforms in reduction of platelet aggregation in experimental sepsis Palavras-chave em inglês: **Blood platelets** Lipopolysaccharides Protein kinase C Protein kinase B Protein kinase G Área de concentração: Farmacologia Titulação: Mestra em Farmacologia Banca examinadora: Sisi Marcondes Paschoal [Orientador] Nicola Amanda Conran Zorzetto Ivani Aparecida de Souza Data de defesa: 11-08-2016 Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

JÉSSICA OLIVEIRA FRADE GUANAES

Orientadora PROF^a DR^a SISI MARCONDES PASCHOAL

MEMBROS:

1. PROF^a DR^a SISI MARCONDES PASCHOAL

2. PROF^a DR^a NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

3. PROF^a DR^a IVANI APARECIDA DE SOUZA

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinada encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

Data: 11 de agosto de 2016

DEDICATÓRIA

"Aos que se tornaram familiares;

Aos que nasceram familiares e aos que conheci antes de ontem;

Aos que me deixaram louco e aos que enlouqueci;

Aos que me criticaram em tudo e a um ou outro que aturou minha "chatura";

Aos amigos que passaram e aos que se estagnaram em mim;

Aos que me consideram muito e aos que com razão fizeram pouco;

Aos que conhecem o que penso e aos que só conhecem o que faço;

Aos que passam o dia todo comigo e aos que estão o tempo todo em mim. Este trabalho é a soma de todos vocês.

E se não é melhor, é por falta de memória, mas não por falta de amigos".

Efraim Rodrigues

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu bom Deus por tudo o que me proporciona. Aos meus pais, que são o principal motivo de eu nunca desistir de sonhar e buscar realizar meus objetivos. Ao meu esposo, que com muito amor me apoiou sem restrições a todos os passos que foram necessários dar. Aos meus irmãos, meus eternos e melhores amigos.

Agradeço a minha orientadora, Sisi, que com muita paciência me ensinou, e que marcou minha vida profundamente. Será uma eterna mestra, e sempre serei grata! A Maria Elisa, professora, amiga, sempre paciente e que desde meus primeiros passos me ampara de maneira inigualável. Muito Obrigada por me ajudar a florescer!

Aos colegas de laboratório, Carol Naime, Carol Caloi, Paulo, Pedro e Gisele, por serem primeiramente amigos, pelas ajudas e quebra-galhos que tantas vezes foram necessários e nunca negados. Obrigada pela companhia, por me acolher e amparar em tantos momentos.

Aos Profs. Dr. Edson Antunes, Dr.Stephen Hyslop e Dr. Gabriel Anhê, pelos laboratórios e ensinamentos; Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Unicamp, Sr. Miguel, Aguinaldo, Toninho e Ivani pela atenção, ajuda e paciência. À Maísa e Cidinha, que tão prestativamente nos ajudam e acolhem.

Aos colegas da "Célula", "Cascata" e "Edema" pela colaboração sempre que precisei. Principalmente a Camilinha, que foi sempre prestativa a me ensinar e ajuda em experimentos difíceis.

À CAPES pelo apoio financeiro.

"A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez". (George Bernard Shaw)

RESUMO

O lipopolissacarídeo (LPS) interage com diferentes células levando ao aumento da síntese e liberação de vários mediadores inflamatórios como interleucinas e óxido nítrico (NO). Além disso, o LPS leva ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). O LPS também interage com plaquetas, consideradas hoje importantes células na inflamação, entretanto, seus efeitos nas plaquetas são muito controversos e pouco se sabe sobre as vias de sinalização envolvidas nos mesmos. A PKC, que possui várias isoformas em sua família, é uma importante enzima para a modulação da reatividade plaquetária, bem como está envolvida em vários efeitos desencadeados pelo LPS. Portanto, no presente trabalho decidimos investigar o papel da PKCo e PKCe na modulação da reatividade plaguetária de ratos injetados com LPS. Para tanto, ratos foram injetados com salina ou LPS e após 6h ou 48h foi determinada a agregação induzida por ADP, bem como a ativação de AKT, os níveis de GMPc e a fosforilação do resíduo Thr308 da VASP em plaquetas. Em alguns experimentos, as plaquetas foram pré-incubadas com os inibidores da PKCδ, rottlerin, ou da PKC₂, SC-3095. A inibição da PKC₂ reduz a agregação de plaguetas de ratos injetados com salina e aumenta, discretamente, os níveis de GMPc intraplaquetário, entretanto, não altera a ativação de AKT ou a fosforilação de VASP. Por outro lado, a inibição da PKCo não altera nenhum dos efeitos avaliados no grupo salina. No grupo LPS 6h é possível observar uma redução da agregação, acompanhada do aumento da atividade da AKT, aumento dos níveis de GMP e fosforilação da VASP, sendo todos estes efeitos revertidos pela pré-incubação das plaquetas com rottlerin. Já no grupo LPS 48h observa-se uma redução da agregação plaquetária acompanhada somente do aumento da fosforilação de VASP. Neste grupo, a inibição da PKCE reverte a fosforilação de VASP, mas não modifica o efeito inibitório do LPS na agregação plaquetária. Portanto, concluímos que em ratos 6h após injeção de LPS a via PKCo-AKT-GMPc-PKG está envolvida na inibição da agregação plaguetária. Enguanto que, em 48h após a injeção de LPS a inibição da agregação ocorre independentemente da PKCδ ou PKCε, bem como da ativação de PKG.

Palavras chaves: Plaquetas, lipopolissacarídeo, PKC, AKT, PKG

ABSTRACT

Lipopolysaccharide (LPS) interacts with different cells leading to an increase of synthesis and release of many inflammatory mediators as interleukins and nitric oxide (NO). Moreover, LPS increases reactive oxygen species (ROS). LPS also may interact with platelets, today considered important cells in inflammation, however, its effects on these cells are very controversial and the signaling pathways have not been elucidate yet. PKC, that comprises several isoforms, is an important enzyme in platelet reactivity modulation, and is involved in several effects triggered by LPS. Therefore, in the present work we decided to investigate the role of PKCS and PKCs in the modulation of platelet reactivity in rats injected with LPS. Rats were injected with saline or LPS and after 6h or 48h the ADP-induced aggregation was determined as well as the activation of AKT, cGMP levels and the VASP phosphorylation on the residue Thr308 in platelets. In some experiments, platelets were pre-incubated with the inhibitors of PKCδ or PKCε, rottlerin or sc-3095, respectively. Inhibition of PKCε reduces platelet aggregation of rats injected with saline and, guietly, increases intraplatelet cGMP levels, however, it does not modify the AKT activation or VASP phosphorylation. On the other side, PKC δ inhibition does not change any effect evaluated in saline group. In the group LPS 6h is possible to observe a reduction on aggregation that is accompanied by increasing of AKT activity, an increase of cGMP levels and VASP phosphorylation, which are reversed by preincubation of the platelets with rottlerin. In the group LPS 48h observes a reduction of platelet aggregation followed only by increasing of VASP phosphorylation. In this group, the inhibition of PKC² reverses the phosphorylation of VASP, but does not modify the inhibitory effect of LPS on platelet aggregation. Therefore, we conclude that in the group LPS 6h, the inhibition of platelet aggregation occurs via PKCo-AKT-GMPc-PKG activation. While in 48h after LPS injection the inhibition of aggregation is independent of both PKCo and PKCc, as well as PKG activation.

Key words: Platelets, lipopolysaccharide, PKC, AKT, PKG

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Receptores e agonistas plaquetários

Figura 2 - Sinalização Inside-out/Outside-in

Figura 3 - Sinalização Plaquetária do ADP

Figura 4 – A Inibição da PKCδ previne parcialmente o efeito inibitório do LPS em 6h na agregação plaquetária induzida por ADP

Figura 5 – Efeito da inibição da PKCδ ou PKCε na fosforilação da AKT em plaquetas de ratos injetados com salina ou LPS

Figura 6 – Efeito da inibição da PKCδ ou da PKCε nos níveis de GMPc em plaquetas de ratos tratados com LPS

Figura 7 – Efeito da inibição da PKCδ ou da PKCε na fosforilação da VASP em plaquetas de ratos injetados com salina ou LPS

Figura 8 – Efeito da inibição da PKC δ e ϵ na agregação plaquetária de ratos tratados com LPS e NAC

Figura 9 – Fosforilação da AKT no resíduo Thr308 em plaquetas de ratos tratados com LPS e NAC

Figura 10 – Fosforilação da VASP no resíduo Ser239 em plaquetas de ratos tratados com LPS e NAC

LISTA DE MATERIAIS

Substância

ADP Anti-AKT Anti-fosfo (Thr308)-AKT Anti-fosfo-(Ser239)-VASP Anti-β-actina LPS Kit GMPc N-acetilcisteína Rottlerin SC-3095 peptide

Procedência

Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA) Santa Cruz Biotech Santa Cruz Biotech Merck Millipore Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA) Cayman (Michigan, EUA) Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA) Tocris Bioscience Santa Cruz Biotech

LISTA DE ABREVIAÇÕES

- OH Radical hidroxila
- 5-HT Serotonina
- AKT Proteína Quinase B
- AMPc Monofosfato Ciclico de Adenosina
- ATP Trifosfato de adenosina Difosfato de adenosina (ADP)
- BH4 5, 6, 7, 8-tetra-hydrobiopterine
- CAT Catalase
- DAG Diacilglicerol
- eNOS Óxido nítrico sintase endotelial
- ERNs Espécies reativas de nitrogênio
- EROs Espécies Reativas de Oxigênio
- FAD Flavina adenina dinucleotideo
- FMN Flavina mononucleotideo
- GCs Guanilil ciclase solúvel
- GMPc Monofosfato Ciclico de Guanosina
- GPx Glutationa peroxidase
- **GSH** Glutationa
- H₂O₂ Peróxido de hidrogênio
- ILAS Instituto Latino Americano da Sepse
- IP₃ Trifosfato de inositol
- LBP Proteína ligante de LPS
- LPS Lipopolissacárideo
- NAC-N-acetilcisteína
- NO Óxido nítrico
- **O**₂ Ânion superóxido
- ONOO Peroxinitrito
- **PAF** Fator de ativação plaquetário
- PDGF Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PI3K Fosfoinositol 3-kinase

- PIP₂-Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
- PKA Quinase dependente de AMPc
- PKC Proteína Quinase C
- PKG Quinase dependente de GMPc
- PLC Fosfolipase C
- PMA Forbol 12-miristato 13-acetato
- SOD Superóxido desmutase
- TLR4 Toll-like receptor 4
- TxA_2 Tromboxano A_2
- UTI Unidades de terapia intensivas
- VASP Fosfoproteína Estimulada por Vasodilatador
- vWF Fator de von Willebrand

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Plaquetas	16
1.2 Septicemia e o Lipopolissacarídeo	19
1.3 Proteína Quinase C (PKC)	22
1.4 Espécies Reativas ao Oxigênio e Nitrogênio	23
1.5 Óxido Nítrico	25
1.6 N-acetilcisteína (NAC)	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivos Específicos	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Animais	29
3.2 Desenho experimental	29
3.3 Obtenção de plaquetas lavadas	30
3.3.1 Taxa de contaminação da suspensão de plaquetas lavadas	30
3.4 Contagem de plaquetas do sangue total	31
3.5 Agregação plaquetária	31
3.6 Western Blotting	31
3.7 Determinação de GMPc intraplaquetário	32
3.8 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Efeito da inibição da PKCδ e PKCε na agregação plaquetária induzida por	ADP 34
4.2 Efeito da inibição da PKCδ ou PKCε na fosforilação de AKT em plaquetas ratos injetados com salina ou LPS	de 36
4.3 Efeito da inibição da PKC δ ou PKC ϵ na formação da GMPc em plaquetas ratos tratados com salina ou LPS	de 38
4.4 Efeito da inibição da PKCδ ou PKCε na fosforilação da VASP em plaqueta ratos injetados com salina ou LPS	s de 39
4.5 Efeito da inibição da PKC δ ou PKCε na agregação plaquetária de ratos tratados com LPS e NAC	41
4.6 Fosforilação da AKT em plaquetas de ratos tratados com LPS e NAC	42
4.7 Fosforilação da VASP no resíduo Ser239 em plaquetas de ratos tratados c LPS e NAC	om 43
5 DISCUSSÃO	44

SUMÁRIO

6 CONCLUSÃO	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plaquetas

Plaquetas são células produzidas a partir de megacariócitos na medula óssea, com 2-3µm de diâmetro, anucleadas, de formato discóide quando inativas, mas quando estimuladas apresentam forma esférica. As plaquetas possuem papel fundamental na hemostasia primária, processo desencadeado pela lesão vascular (Mazzarello & Calligaro, 2001; Gilligan et al, 2002; Yaguchi et al, 2004; Brewer, 2006; Semple et al, 2011). Ademais, as plaquetas são essenciais na trombose, no combate a agentes infecciosos e participa da etapa inicial do reparo tecidual (Castro et al, 2006; Falcão et al, 2013). Sugere-se que a capacidade de atuar em respostas imunes devese às suas características estruturais e a produção de proteínas e enzimas que garantem às plaquetas funções protetoras (Semple et al, 2011). Além de liberarem várias substâncias de seus grânulos, alguns estudos mostram que as plaquetas possuem maquinaria suficiente para gerar suas próprias proteínas durante a hemostasia ou processo inflamatório (Semple et al, 2011).

Estruturalmente, as plaquetas podem ser divididas em quatro zonas: (1) citosol: apresenta algumas organelas como mitocôndria e grânulos alfa e densos, que armazenam inúmeras substâncias como fator de von Willebrand (vWF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator 4 plaquetário, fatores de coagulação e inibidor do ativador plasminogênio alfa, trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP) e serotonina (Castro et al, 2006). (2) citoesqueleto: composto principalmente por actina; (3) sistema tubular denso: local onde o cálcio é sequestrado e onde enzimas envolvidas na síntese de prostaglandina se localizam (Blockmans et al, 1995); (4) membrana plasmática: onde estão expressos diferentes receptores incluindo integrinas (αIIbβ3), glicoproteínas (GPIb/IX) e imunoglobulinas (O'Toole et al, 1994). Quando as plaquetas são ativadas, filamentos de actina se associam com os de miosina, gerando a tensão requerida para a centralização dos grânulos.



Figura 1 - Receptores e agonistas plaquetários Fonte: Adaptado de Castro et al, 2006.

Para ativação plaquetária, agonistas ligam-se a seus receptores e desencadeamuma série de reações intraplaquetárias. Dentre os agonistas podemos citar a trombina, colágeno, epinefrina, serotonina (5-HT), tromboxano A₂ (TxA₂), vasopressina, ADP, fator de ativação plaquetário (PAF) e colágeno (Blockmans et al, 1995; Jung & Moroi, 2008) (Figura 1).

A adesão plaquetária é considerada o passo inicial na formação do tampão hemostático. As plaquetas se aderem ao fator de von Willebrand via receptores GPIb/IX/V e ao colágeno via GPVI, o que resulta na ativação plaquetária (Gawaz et al, 2005).

Durante o processo de adesão ocorre a liberação do conteúdo granular e síntese de TxA₂, o que acarreta a ativação de plaquetas circulantes, recrutamento das mesmas para região lesada e agregação plaquetária (Kamath et al, 2001).

Diferentes substâncias incluindo TxA₂, trombina e ADP, se ligam à receptores específicos, na sua maioria acoplados à proteína G, e iniciam a ativação plaquetária culminando com a ativação da integrina αIIbβ₃, receptor de fibrinogênio (Shatil et al, 1994).

O processo de ativação plaquetária é dividido em duas etapas: *Inside-out* e *Outside-in*. A sinalização *inside-out* incia-se com a ligação de agonistas aos seus respectivos receptores, o que leva ao aumento de Ca²⁺ intracelular e ativação de enzimas, incluindo quinases, que fosforilam a região citoplasmática da integrina β_3 , acarretando a mudanças de conformação da α IIb β_3 e aumentando sua afinidade pelo seu principal ligando, o fibrinogênio. Nesta etapa ocorre a fosforilação de resíduos de tirosina, treonina e/ou serina de diferentes quinases, incluindo enzimas da família Src, isoformas da Proteína Quinase C (PKC) e Proteína Quinase B (AKT) (Arderiu et al, 2002; Guidetti et al, 2015; Zaid et al, 2015). A sinalização *Outside-in* inicia-se com a ligação do fibrinogênio ao seu receptor, ativando diferentes enzimas que levarão a ativação máxima das plaquetas e estabilização da agregação plaquetária (Shattil et al, 1998; Parise, 1999; Shattil & Newman, 2004), como observado na figura 2.



Figura 2 - Sinalização Inside-out/Outside-in Fonte: Shattil et al, 1998

O ADP é considerado um agonista fraco quando comparado com trombina ou colágeno, entretanto modula positivamente a agregação induzida por outros agonistas. A estimulação plaquetária pelo ADP leva a mobilização de Ca²⁺ intracelular e inibição da adenilil ciclase via ativação dos receptores P₂Y₁ e P₂Y₁₂ que são acoplados as proteínas Gq e Gi, respectivamente (Léon et al, 1999; Gachet, 2001).

O receptor P₂Y₁ ativa a enzima fosfolipase C (PLC β). A PLC β cliva o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) em diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP₃). O IP₃ liga-se à receptores presentes no sistema tubular denso e permite a liberação de Ca²⁺. O aumento de Ca²⁺ intracelular promove o rearranjo do citoesqueleto e a formação de pseudópodes. O DAG irá ativar a PKC, que ativará a integrina αIIb β 3 e promoverá agregação com auxílio do fibrinogênio (Vanni et al, 2007). A ativação

apenas do receptor P_2Y_{12} não leva a formação do agregado plaquetário, mas através da redução dos níveis intracelulares de AMPc, potencializa a resposta proveniente de ativação do receptor P_2Y_1 (Gachet, 2001; Hechler & Gachet, 2011).

De acordo com Hechler e Gachet (2011), o receptor P_2Y_{12} também ativa a cascata de sinalização da fosfoinositol 3-kinase (PI3K). A PI3K, via ativação da AKT, ativa a integrina $\alpha II_b\beta_3$. Os níveis diminuídos de AMPc reduz a ativação da PKA e, assim, observamos menos fosforilação da Fosfoproteina Estimulada por Vasodilatador (VASP, do inglês Vasodilatador Stimulated Phosphoprotein). A VASP não fosforilada corrobora para a ativação plaquetária (Figura 3).



Figura 3 - Sinalização Plaquetária do ADP Fonte: adaptado de Badimon & Vilahur, 2008

1.2 Septicemia e o Lipopolissacarídeo

A sepse é um grande problema de saúde pública no mundo todo (Ibeagha-Awemu et al, 2008) e está entre uma das mais importantes causas de morte nas unidades de terapia intensivas (UTI) (Bochud e Calandra, 2003). Isto se deve provavelmente, devido à hospitalizações de pacientes portando graves doenças e a alta incidência de infecções hospitalares (Alberti et al, 2002). De acordo com as estatísticas do ILAS (Instituto Latino Americano da Sepse, 2014) a porcentagem de letalidade em pacientes com sepse é assustadora e preocupante. De acordo com o estudo PROGRESS (2015) a mortalidade devido à septicemia alcança aproximadamente 45% da população mundial acometida por sepse, sendo que o Brasil possui letalidade em 67,4% e está distante de outros países como a Alemanha, Argentina, Canadá, Estados Unidos e Austrália que não ultrapassam os 50%.

A sepse pode ser causada não só por bactérias gram-negativas, mas também por toxinas e/ou partículas de proteínas de bactérias gram-positivas, vírus ou fungos ou por mediadores pró-inflamatórios liberados pelas células imunes (Jean-Baptiste, 2014). As bactérias gram-negativas mais comuns na sepse severa e no choque séptico são a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Klebsiella* que desencadeiam a maior parte de seus efeitos através do lipopolissacárideo (LPS) encontrado na parede de tais organismos (Bochud e Calandra, 2003).

Os sintomas apresentados por um paciente com sepse podem ser diferentes e dependem de inúmeras respostas do hospedeiro, abrangendo alterações hemodinâmicas, hematológicas e falência de órgãos associadas à inflamação sistêmica. Os sintomas frequentemente observados na sepse são: febre, leucocitose ou leucopenia, taquicardia e taquipenia (Annane et al, 2003). A diminuição da atividade cardiocirculatória é resultado da liberação descontrolada de cininas, prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico (NO). Com o acréscimo da redução do débito cardíaco, ocorre colapso no sistema vascular (choque séptico). A diminuição da pressão arterial e da perfusão tecidual juntamente com a reação inflamatória gera danos funcionais nos sistemas renal, hepático e pulmonar, que podem culminar na disfunção múltipla de órgãos (Brandtzaeg et al, 1996; Ribeiro e Moreira, 1999).

O LPS é o componente principal da membrana externa de bactérias gramnegativas e induz respostas como febre, aumento da coagulação, choque séptico, disfunção de órgãos e até mesmo a morte (Karima et al, 1999; Alexander e Rietschel, 2001; Bochud e Calandra, 2003).

O LPS é um glicolipídeo complexo constituído de uma porção lipídica denominada lipídeo A, uma região do centro polissacarídeo que geralmente possui estrutura similar dentro de um gênero ou espécie de bactéria, e cadeias laterais O-específicas que conferem uma identidade sorológica única às espécies de gram-negativas. O lipídeo A é o principal componente responsável pelas manifestações da

atividade de endotoxina em pacientes com septicemia por bactérias gram-negativas (Golenbock et al, 1991; Amura et al, 1998; Alexander e Rietschel, 2001; Ibeagha-Awemu et al, 2008). O LPS é capaz de ativar diferentes tipos de células como leucócitos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos, células endoteliais e plaquetas. O LPS induz a ativação e interação de vários efetores, como sistema complemento, coagulação, bradicinina e sistema hematopoiético, acompanhado pela liberação de inúmeros mediadores inflamatórios, incluindo eicosanóides, citocinas, quimicionas, proteínas de adesão, radicais livres, fator de ativação plaquetário e NO (Mccuskey et al, 1996; Perera et al, 2001). A liberação destes agentes contribui para a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que também causam danos no organismo (Victor et al, 2004).

A ativação do LPS pode ocorrer devido à ligação do LPS na molécula CD14. O LPS, ligado ou não à proteína ligante de LPS (LBP), se liga a molécula CD14, que por sua vez ativa os receptores transmembrana TLR4 (toll-like receptor 4). A presença do TLR-4 já foi descrita em diversas células como leucócitos, endotélio vascular e plaquetas (Amura et al, 1998; Ibeagha-Awemu et al, 2008). Os mecanismos pelos quais o LPS leva a ativação celular ainda não foram bem elucidados, mas sabe-se que enzimas como tirosinas-quinases e a PKC apresentam um papel importante neste evento (Andonegui et al, 2005; Jayachandran et al, 2007; Ibeagha-Awemu et al, 2008). Estudos têm mostrado que a PKC é ativada em macrófagos 15 a 30 minutos depois da exposição ao LPS e que está envolvida na secreção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-1 β (Shapira et al, 1997; Dauphinee e Karsan, 2006).

Há uma grande controvérsia a respeito dos reais efeitos do LPS em plaquetas. Zhang e colaboradores (2009) mostraram que o LPS proveniente de *E.coli* é capaz desestimular a secreção dos grânulos plaquetários de humanos e potencializar a agregação induzida por baixas concentrações de trombina e colágeno. Enquanto Sheu e colaboradores (1998 e 1999) observaram que a agregação de plaquetas humanas e de coelho induzida por colágeno é inibida, de forma dependente da concentração de LPS de *E. coli*. Este efeito foi acompanhado do aumento de GMPc, inibição da mobilização de Ca⁺² intracelular e inibição da ativação da PKC (Sheu et al, 1998 e 1999). Corroborando com estes resultados, nosso grupo verificou que o tratamento de ratos com LPS por 6h, 8h e 48h causa redução significativa da adesão de plaquetas ao fibrinogênio e da agregação induzida por ADP (Casarin et al, 2011; Lopes-Pires et al, 2012). Além disso, também mostramos que o tratamento de ratos com LPS leva a um aumento significativo da produção de espécies reativas de O₂ (EROs) em plaquetas (Casarin et al, 2011; Lopes-Pires et al, 2012).

Em resultados obtidos em estudos clínicos também há controvérsias com relação a reatividade plaquetária na sepse. Alguns grupos mostram que pacientes com sepse apresentam diminuição da agregação plaquetária frente a diferentes agonistas, tais como ADP, colágeno, TxA₂ e ácido araquidônico (Cowan et al, 1976; Boldt et al, 1997, Yaguchi et al, 2004). Por outro lado, Gawaz et al (1997) reportaram um aumento na agregação em pacientes com sepse.

1.3 Proteína Quinase C (PKC)

A PKC, uma serina/treonina quinase, representa uma família composta de mais de 11 isoformas e é alvo constante de estudos, uma vez que tem papel fundamental na função celular e proliferação (Gopalakrishna e Jaken, 2000). Estas isoformas podem ser divididas em três grupos: (I) convencionais (PKC α , β 1, β 2, e γ), que são dependente de cálcio e de DAG ou esteres de forbol como forbol 12-miristato 13-acetato (PMA); (II) não-convencionais (PKC δ , ϵ , θ , e η) que são independentes de cálcio, entretanto, necessitam do DAG para sua estimulação; (III) atípicas (PKC ξ e λ) que não requerem Ca²⁺ ou DAG para sua ativação (Takai et al, 1979; Blumberg, 1991; Stabel e Parker, 1991; Gopalakrishna e Jaken, 2000; Chen et al, 2014). A atividade enzimática da PKC foi inicialmente identificada em cérebros de ratos por Nishizuka e colaboradores (1984) como um modelo de serina e treonina quinase citoplasmática, que aparentava ser ativa proteolíticamente por uma pró-enzima, mas logo depois foi descoberto que a ativação era realizada por diacilglicerol.

Trabalhos mostram que a expressão e a ativação de diferentes isoformas de PKC podem ser determinadas por condições do ambiente como o estresse oxidativo. A indução de estresse oxidativo em células endoteliais coronarianas, por privação de soro, leva ao aumento de ativação da PKCδ e redução da atividade da PKCε (Monti et al, 2010).

Também tem sido demonstrado que a isoforma δ é uma importante mediadora dos efeitos do LPS. O aumento da expressão da iNOS e diminuição da fosforilação de IkappaB-alfa em micróglia murina exposta ao LPS são mediados pela PKC δ e β (Wen et al, 2011; Kim et al, 2013). Ainda, o LPS é capaz de aumentar a síntese de NO em macrófagos, na presença de altas concentrações de glicose, via ativação da PKC δ e α (Hua et al, 2012).

Em plaquetas são descritas oito isoformas, incluindo PKCs convencionais ($\alpha \in \beta$), não-convencionais (ϵ , η , θ , δ) e atípicas (ζ , λ), e estão envolvidas na regulação de diversos processos, seja de maneira positiva ou negativa, incluindo a ativação de integrinas, sinalização *Outside-in*, formação de filopodia e lamelopodia, secreção dos grânulos plaquetários, mobilização de Ca²⁺, atividade procoagulante, agregação plaquetária, formação de trombo, e adesão de plaquetas (Watson e Hambleton, 1989; Haimovich et al, 1996; Rosado e Sage, 2000; Gresele e Agnelli, 2002; Buensuceso et al, 2005; Bhavanasi et al, 2015; Heemskerk et al, 2011; Mayanglambam et al, 2011).

Há relatos de que a PKC é o maior mediador na ativação da NADPH oxidase. O forbol éster, um potente indutor da produção de O_2^- ativa diretamente a PKC e, consequentemente a NADPH oxidase (Segal e Jones, 1979; Suzuki e Lehrer, 1980). Além disso, a PKC também modula a atividade catalítica da óxido nítrico sintase ndotelial (eNOS). A estimulação da isoforma δ da PKC provoca fosforilação da eNOS em sítios inibitórios Thr497 e Ser116, evitando a ativação descontrolada desta enzima (Monti et al, 2010).

1.4 Espécies Reativas ao Oxigênio e Nitrogênio

Além de liberar os mediadores inflamatórios clássicos, o LPS induz a geração de grande quantidade de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) em diferentes tipos celulares (McCuskey et al, 1996). Dentre as ERNs podemos citar o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO⁻) formado pela reação entre o NO e o ânion superóxido (O_2^{-1}).

Dentre as EROs podemos citar o ânion superóxido (O₂-), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila ([•]OH). Há varias fontes de produção destas espécies, incluindo a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, xantina oxidase, ciclo-oxigenases, lipo-oxigenases, mieloperoxidases, citocromo-P450, monooxigenases, óxido nítrico sintases (NOS) desacoplada, heme oxigenases, peroxidases e NADPH oxidases produzem EROs. De acordo com sua localização na célula, essas espécies podem ser geradas no citosol, extracelularmente ou em

compartimento intracelular específico (Krotz et al, 2002; Griendlling e FitzGerald, 2003).

Evidências sugerem que a NADPH oxidase seja a principal fonte de geração de O_2^- (Somers et al, 2000; Krause, 2007). A NADPH oxidase possui duas subunidades na membrana citoplasmática, a gp91phox e a p22phox, que juntas formam o flavocitocromo b558 e outras três subunidades citosólicas: a p47phox, p67phox e a p40phox (Gianni et al, 2008; Bäumer et al, 2008). Para que a enzima seja ativada, é preciso fosforilação e translocação dos componentes citosólicos para o flavocitocromo b558. (Bokoch, 1994). Sabe-se até hoje da existência de sete enzimas pertencentes à família das NADPH oxidases – as NOX 1 a 5, e as Duox 1 e 2 (Gianni et al, 2008).

A cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria é a principal fonte de ATP nas células sendo fundamental para a vida, e é nesta etapa que ocorre o "escape" de elétrons que resulta na formação de O₂⁻. (Kovacic et al, 2005).

Outra espécie que pode ser formada é o H₂O₂, que tem sua formação por meio da superóxido desmutase (SOD) e é rapidamente degradado pelas enzimas catalase e glutationa peroxidase (Krötz et al, 2002). Ele é mais estável que os outros EROs e permeável às membranas celulares (Ferreira e Matsubara, 1997). O ·OH é altamente reativo e com meia-vida em solução aquosa de 1 nanosegundo, podendo ser gerado pela mieloperoxidase ou reações catalisadas pelo ferro (reação de Fenton).

O estresse oxidativo está associado com diversos eventos patológicos, como hipertensão, aterosclerose e sepse (Griendlling e FitzGerald, 2003). As espécies reativas, no estresse oxidativo, levam a danos protéicos, lipídicos e de material genético (Jacob, 1995). Os organismos possuem uma série de mecanismos de defesa para diminuir a superprodução de EROs, como substâncias e enzimas antioxidantes (Cadenas et al, 1997). As enzimas de defesas antioxidantes incluem a superóxido desmutase (SOD), a glutationa peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Os antioxidantes não enzimáticos são representados pelo ácido ascórbico (Vitamina C), o α -tocoferol (Vitamina E), a glutationa (GSH), carotenóides, flavonóides entre outros (Masella et al, 2005).

Na sepse estas espécies estão diretamente ligadas a disfunção múltipla de órgãos (Keen et al, 1991; Galley et al, 1996).

1.5 Óxido Nítrico

O NO, uma espécie reativa de nitrogênio (ERN) com meia vida de 4 a 8 segundos, capaz de livre difusão nas membranas celulares é atuante em diversos processos biológicos, uma vez que é sintetizado por vários tipos celulares (Dias et al, 2011). O NO é um vasodilatador endógeno, inibidor plaquetário, sendo assim considerado como um agente antitrombótico.

A síntese do NO se dá por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS). Foram descritas três famílias de NOS: as constitutivas – endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) e a não constitutiva – induzível (iNOS) (Nassem, 2005). O NO é formado a partir da L-arginina e, de acordo com Michael e Vanhoute (2010), além do Ca²⁺, a atividade enzimática da eNOS requer calmodulina, NADPH, flavina adenina dinucleotideo (FAD), flavinamononucleotideo (FMN) e 5, 6, 7, 8-tetra-hydrobiopterine (BH4).

A atividade enzimática da NOS pode ser modulada por fosforilações em resíduos específicos de aminoácidos. Por exemplo, as fosforilações nos resíduos Thr497 e Ser116 inibem a atividade da enzima (Dudzinski e Michel, 2007; Mount et al, 2007), enquanto a fosforilação da Ser1179 em ratos e Ser1177 em humanos leva a sua ativação (Monti et al, 2010). Já foram identificadas algumas enzimas que são capazes de levar a estas fosforilações incluindo a PKC e a AKT (Cathcart, 2004; Michael e Vanhoutte, 2010; Loegering e Lennartz, 2011), sendo que a AKT é capaz de ativar a eNOS diretamente em células endoteliais (Michell et al, 1999; Montagnani et al, 2001). A PKCō também pode ativar diretamente a NOS através da sua fosforilação no resíduo Ser1179 (Monti et al, 2010). Por outro lado, a NOS pode ser inativada pela fosforilação dos resíduos Thr497 e Ser116 pela PKCε, quando a PKCō está inativa (Monti et al, 2010).

Uma vez sintetizado, o NO pode interagir com a guanilil ciclase solúvel ativando esta enzima, que é responsável pela conversão do GTP a GMPc (Zhao et al, 2015; Elhwuegi, 2016). Quando em grandes quantidades, o NO pode interagir com o ânion superóxido (O_{2⁻¹}) levando a produção de peroxinitrito (ONOO⁻, Bian e Murad, 2003). O ONOO⁻ também é uma espécie reativa de nitrogênio, muito reativo e envolvido em vários efeitos do NO como a nitração de fibronectina, levando ao comprometimento da função endotelial e também da interação célula-célula do tecido matricial vascular (Degendorfer et al, 2016). Em plaquetas, o efeito do ONOO⁻ ainda é controversio.

Alguns trabalhos mostram que o ONOO⁻ pode ativar as plaquetas o qual é acompanhado de aumento da expressão da P-selectina e da concentração intracelular de Ca²⁺ (Redondo et al, 2005; Brown et al, 1998; Moro et al, 1994; Schildknecht et al, 2008). Outros trabalhos mostram que o ONOO⁻ inibe a ativação plaquetária através da inibição da atividade mitocondrial (Misztal et al, 2013; 2014) ou da nitração da ciclooxigenase (COX) e α -actinina (Boulos et al, 2000; Marcondes et al, 2006).

O GMPc leva a ativação de uma enzima denominada PKG. A PKG é a enzima efetora de muitos efeitos do NO (Francis et al, 2010). A ativação da PKG pode inibir a ativação plaquetária por diferentes mecanismos como a fosforilação do receptor de IP3 no sistema tubular denso, levando à diminuição da liberação de Ca²⁺, inibição da entrada de Ca²⁺ extracelular, redução da ativação do receptor de fibrinogênio e da polimerização da actina (Geiser et al, 1994; Horstrup et al, 1994; Cavallini et al, 1996; Butt et al, 2001; Smolenski, 2012).

Um dos principais alvos da PKG é a fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP). A VASP é expressa em altas concentrações em plaquetas, cerca de 25µM (Eigenthaler et al, 1992) e seus principais sítios fosforilados são a Ser157 e Ser239, pela PKA e PKG, respectivamente (Butt et al, 1994; Smolenski et al, 1998). Portanto, como a fosforilação no resíduo Ser239 indica a atividade da PKG, a fosforilação na Ser239 da VASP pode ser utilizada como marcador para monitorar a ativação e sinalização da via NO/GMPc/PKG (Smolenski et al, 1998; Harbeck et al, 2000; Lawrence e Pryzwansky, 2001).

1.6 N-acetilcisteína (NAC)

Estruturalmente, a NAC é um composto tiólico, com um enxofre ligado a um álcool, e vem sendo utilizada há mais de 40 anos na clínica, sendo que seu primeiro uso terapêutico foi no tratamento de doenças pulmonares congestivas e obstrutivas, como bronquite crônica e fibrose cística (Pastor et al, 1997). A NAC pode se acumular no interior das células já que tem a capacidade de difundir-se pelas membranas celulares, uma vez que o grupo acetil da amina da NAC não é polarizado. No interior da célula, a NAC é desacetilada, ficando aprisionada no interior da mesma (Raftos et al, 2007). Sua meia-vida é de aproximadamente 5h (Sansone e Sansone, 2011).

A NAC é um sequestrador de radicais livres, e serve como precursora do principal antioxidante celular, a glutationa (Balci et al, 2016). Ela reduz eficientemente as EROs, e tem grande capacidade de sequestrar diretamente agentes oxidantes. Seus efeitos antioxidantes são exercidos indiretamente, e por ser precursor da glutationa, que é um antioxidante natural, protege de danos causados pelo oxigênio *In vitro* ou *In vivo* (Aruoma et al, 1989; Pastor et al, 1997; Cuzzocrea et al, 2000).

Este antioxidante é comumente utilizado em casos de intoxicação com paracetamol, que é causada devido a depleção grave de glutationa hepática (GSH) (Papazoglu et a, 2015; Yon et al, 2016) e na prevenção de nefropatia por radiocontraste (Lavoie et al, 2008). Além disso, estudos exploram seu uso em distúrbios do sistema nervoso central decorrente do estresse oxidativo (Lavoie et al, 2008).

2 OBJETIVOS

Estudar o papel da PKCδ e PKCε na modulação do efeito inibitório do LPS na agregação plaquetária.

2.1 Objetivos Específicos

- Investigar o papel das isoformas PKCδ e PKCε na agregação plaquetária de ratos tratados com LPS;
- Investigar o efeito das PKCδ e PKCε no aumento da ativação da AKT em plaquetas de ratos tratados com LPS;
- Investigar o papel das PKCδ e PKCε na modulação dos níveis de GMPc intraplaquetário;
- ✓ Determinar o papel das PKCδ e PKCε na ativação da PKG;
- Investigar o efeito do tratamento com NAC em ratos previamente tratados com LPS na modulação da agregação plaquetária, na ativação da AKT e na ativação da PKG.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando 250-340g, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – Unicamp). Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-IB-Unicamp, protocolo nº 3316-1. Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia (Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp), onde foram mantidos a 24ºC, com iluminação diária de 12h e com água e alimentação *ad libitum*.

3.2 Desenho experimental

Foram realizados 4 principais grupos experimentais:

- Ratos receberam uma injeção de salina (300 μL, i.p.);
- Ratos receberam uma única injeção de LPS de E.coli (0111:B4, 1mg/Kg, i.p.);
- Ratos receberam uma injeção de salina e após 30 minutos foi administrado NAC (150 mg/kg, i.p.);
- Ratos receberam uma injeção de LPS e após 30 minutos foi administrado NAC (150 mg/kg, i.p.).

Após 6h ou 48h do tratamento com LPS ou salina, os animais foram anestesiados com isoflurano e uma incisão longitudinal no abdômen foi feita para a coleta de sangue arterial obtido do ramo descendente da aorta.

Em alguns experimentos, após a obtenção das plaquetas, as mesmas foram pré-incubadas por 3 min com o inibidor de PKCε (sc-3095, 1 μM) ou de PKCδ (rottlerin, 5 μM) antes dos ensaios de agregação, determinação de GMPc e western blotting.

3.3 Obtenção de plaquetas lavadas

O sangue dos ratos, controles ou tratados com LPS, foi coletado em ACD-C (citrato de sódio 12.4 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM) (9:1 v/v). Primeiramente o PRP foi obtido por centrifugação do sangue total a 200 g em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 0.5 mM, citrato trisódico 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12.5 mM, pH 6) na proporção 7:5 (tampão/plasma) foi adicionado ao PRP e centrifugados por 10 min a 800 g. O precipitado plaquetário foi ressuspenso em tampão de lavagem e novamente centrifugado a 800 g por 10 min. Finalmente, as plaquetas foram ressuspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de Ca²⁺ e seu número ajustado para 1,2x10⁸ plaquetas/ml através de contagem manual utilizando-se câmara de Neubauer. Ao final, foi adicionado cloreto de cálcio à suspensão plaquetária para uma concentração final de 1mM.

3.3.1 Taxa de contaminação da suspensão de plaquetas lavadas

Para controle de pureza, o número de células foi determinado na suspensão de plaquetas lavadas obtidas de 4 diferentes animais dos grupos experimentais. Foram contados os números de plaquetas, de leucócitos (WBC) e hemácias (RBC). O número de plaquetas nos grupos tratados com LPS foi significativamente menor quando comparado aos grupos controle (redução de 7,8 e 3,4 vezes nos grupos LPS 6h e 48h, respectivamente – tabela 1).

O número de células vermelhas e brancas na suspensão plaquetária dos ratos 6h após a injeção de LPS foi o mesmo daquele observado no grupo controle. Entretanto, no grupo LPS 48h a contaminação da suspensão plaquetária por hemácias e leucócitos foi maior do que a do grupo controle. A porcentagem de leucócitos e hemácias foi 3,9 e 8,5 vezes maior que o grupo controle, respectivamente (tabela 1).

TRATAMENTO	TOT. CEL/µL	PLAQUETAS/µL	WBC (%)	RBC (%)
SALINA	12,7.10 ⁶ ±3.10 ⁶	12,5.10 ⁶ ± 3,1.10 ⁶	0,013 ±0,003	1,85 ± 0,27
LPS 6 HORAS	2,0.10⁶±0,5 .10 ⁶	1,94.10 ⁶ ±0,5.10 ⁶	0,023 ±0,002	1,72 ± 0,86
LPS 48 HORAS	3,0.10 ⁶ ±0,3.10 ⁶	2,73.10 ⁶ ±0,2.10 ⁶	0,110 <i>±0,03</i>	8,44 ± 1,99

Tabela 1 – Contaminação de leucócitos e hemácias na purificação de plaquetas lavadas.

Os valores são representativos da média ± EPMde 4 experimentos

3.4 Contagem de plaquetas do sangue total

Imediatamente após a coleta do sangue arterial, 10 µl de sangue foram adicionados a 190 µl de oxalato de amônio 1%. Após 10 min, foi realizada a contagem das plaquetas em Câmara de Newbauer.

3.5 Agregação plaquetária

A suspensão de plaquetas lavadas (400ul) foi transferida para a cuveta de agregação e levada ao agregômetro de 2 canais (Chrono-log Lumi-Aggregometer model 560-Ca, Havertown, PA, EUA). O aparelho foi calibrado para 0% (suspensão de plaquetas lavadas) e 100% (solução de Krebs-Ringer). Em seguida a agregação foi induzida por ADP (5 μ M) e monitorada por 10 min. Em alguns experimentos as plaquetas foram incubadas com inibidor específico da PKC δ , Rottlerin (Sigma-Aldrich), ou com inibidor específico da PKC ϵ , sc-3095 (Santa Cruz Biotech) por 3 min antes da adição de ADP 5 μ M.

3.6 Western Blotting

As amostras provenientes de plaquetas de ratos do grupo controleou tratados com LPS (4x10⁸ plaquetas/ml) foram incubadas com inibidores da PKCδ ouPKCε (Rottlerin ou SC-3095, respectivamente) por 3 min antes da adição de ADP (5 μM). A reação foi parada com solução de Laemmli (3:1) e as amostras foram armazenadas

para eletroforese. A separação das proteínas contidas nas amostras de plaquetas (25µL) foi realizada em gel de poliacrilamida-SDS (10%) e em seguida as mesmas foram transferidas para membranas de PVDF por 90 min a 100 mA. As membranas foram bloqueadas por 60 min, temperatura ambiente, com BSA 1% em TBS-T (Tris 200 mM, NaCl 1.5 M, pH 7.6 e Tween 0.1%), a fim de remover sítios inespecíficos, e em seguida incubadas por 16h (4°C) com os anticorpos primário: anti-P(Ser234)-VASP, anti-AKT, anti-P(Thr308)-AKT, anti-β-actina. Após incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas com solução de TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com a peroxidase por 1h a temperatura ambiente. Novamente as membranas foram lavadas com solução de TBS-T e então as bandas imunorreativas foram detectadas por quimioluminescência.

3.7 Determinação de GMPc intraplaquetário

As plaquetas $(1,2x10^8 \text{ plaquetas/ml})$ foram incubadas com inibidor de fosfodiesterase-3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX, 2mM) por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida, as plaquetas pré-incubadas ou não com os inibidores da PKCō ou PKCɛ, (Rottlerin ou sc-3095, respectivamente) foram ativadas com ADP (5µM). A reação foi interrompida 30 min após a adição de ADP ou salina à suspensão plaquetária com etanol absoluto acidificado gelado em uma concentração final de 67% (v/v). Logo após as amostras foram rigorosamente agitadas por 30s.

As amostras foram incubadas no gelo por 30 min e centrifugadas a 4000g por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e separados e os precipitados foram lavados com 0,5 ml de etanol acidificado 67% (v/v) antes da centrifugação de 14000g por 5 min a temperatura ambiente.

Os sobrenadantes desta última centrifugação foram coletados e adicionados aos sobrenadantes coletados da centrifugação anterior e foram secos a 55-60°C em banho-maria sob corrente de nitrogênio. As amostras foram armazenadas a -20°C até que a determinação do GMPc fosse realizada. O GMPc foi medido utilizando-se o kit da Cayman (Ann Arbor, MI, EUA) seguindo as instruções do fabricante e as concentrações foram determinadas por Elisa. Cada amostra foi quantificada em duplicata e os resultados expressos em pmol/ml.

3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias ± erro padrão das médias (EPM) de n experimentos. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Valores de p<0,05 foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da inibição da PKCδ e PKCε na agregação plaquetária induzida por ADP

Como é possível verificar na figura 4A, o inibidor da PKC ϵ , sc-3095 (1µM), inibiu significativamente a agregação induzida por ADP (5µM) no grupo onde os ratos foram injetados com salina (inibição de 33%, p<0,05). Apesar de não ser significativo, o inibidor da PKC δ , Rottlerin (5µM) também reduziu a agregação por ADP neste grupo (inibição de 19%).

A agregação de plaquetas de ratos injetados com LPS foi significativamente menor do que a agregação observada no grupo controle (inibição de 62% e 53% na agregação de plaquetas 6h e 48h após a injeção de LPS, respectivamente) (figura 4 B e C). Diferente do observado com o grupo injetado com salina, a incubação de plaquetas de ratos 6h após a injeção de LPS por 3 min com Rottlerin aumentou significativamente a agregação induzida por ADP (aumento de 20%). Entretanto, a agregação na presença do Rottlerin ainda é 30% menor comparado ao grupo salina (Figura 4A e 4B).

A incubação de plaquetas com sc-3095 não modificou a agregação de ratos injetados com LPS em 6h (figura 4B). A agregação de plaquetas de ratos injetados com LPS em 48h foi discretamente aumentada na presença de Rottlerin (aumento de 12%), mas não foi modificada na presença de sc-3095 (figura 4C).



Figura 4 – A inibição da PKCδ previne parcialmente o efeito inibitório do LPS em 6h na agregação plaquetária induzida por ADP. Ratos foram injetados com LPS (1 mg/kg) e depois de 6h (painel B) e 48h (painel C), o sangue foi coletado. O painel A mostra a agregação de plaquetas lavadas de ratos injetados com salina. Plaquetas lavadas (1,2x10⁸ plaquetas/ml) foram incubadas com o inibidor da PKCδ, Rottlerin (5µM) ou com o inibidor da PKC ε, sc-3095 (1µM), e após 3min foi adicionado o ADP (5µM). A curva de agregação foi monitorada por 10 min e os resultados mostrados são referentes a media ± EPM (*n*=4 diferentes animais). * *P*<0.05 comparado com o controle do grupo salina. #*P*<0.05 comparado com o controle do grupo injetado com LPS.

4.2 Efeito da inibição da PKCδ ou PKCε na fosforilação de AKT em plaquetas de ratos injetados com salina ou LPS

A ativação de plaquetas por ADP (5 μ M) de ratos injetados com salina causou um aumento de 45% da fosforilação da AKT no resíduo Thr308 (figura 5). A préincubação das plaquetas com rottlerin (5 μ M) ou sc-3095 (1 μ M) por 3 minutos alterou a fosforilação da AKT em plaquetas ativadas.

A ativação das plaquetas de ratos, 6h após a injeção de LPS, por ADP (5μM) causou um aumento significativo (2,4 vezes) da fosforilação da AKT no resíduo Thr308 (figura 5). O aumento da fosforilação da AKT em plaquetas ativadas de ratos injetados com LPS 6h foi prevenido pela pré-incubação com rottlerin, mas não foi modificado pelo sc-3095.

A ativação de plaquetas com ADP (5μM), não causou aumento da fosforilação da AKT em ratos 48h após a injeção de LPS. A razão entre as bandas imunorreativas para Thr308-AKT e AKT não fosforilada não foi modificada por rottlerin ou sc-3095 (figura 5).



Figura 5 – Efeito da inibição da PKCδ ou PKCε na fosforilação de AKT em plaquetas de ratos injetados com salina ou LPS. Ratos foram injetados com LPS (1 mg/kg) ou salina (painel A) e depois de 6h (painel B) ou 48h (painel C) o sangue foi coletado. As amostras ativadas com ADP (5 μM) tiveram a reação interrompida pelo acréscimo de tampão Laemmle (3:1). As amostras (25μ L/well) foram corridas em gel SDS-PAGE 10% e analisadas por Western bloting usando os anticorpos anti-AKT e anti-fosfo-(Thr308)-AKT. Em alguns experimentos as plaquetas foram pré-incubadas 3 min com rottlerin ou sc-3095 antes da ativação com ADP. Os resultados são representativos pela razão das densitometrias da banda imunorreativa para p-(Thr308)-AKT e AKT. Bandas imunorreativas para AKT e p-AKT representativas estão apresentadas sobre as barras. *n*=5 diferentes animais. #*P*<0.05 comparado com plaquetas não estimuladas do grupo LPS 6h. &P<0.05 comparado com plaquetas não estimuladas do grupo LPS 6h.

4.3 Efeito da inibição da PKC δ ou PKCε na formação da GMPc em plaquetas de ratos tratados com salina ou LPS

A ativação de plaquetas por ADP não alterou os níveis de GMPc intraplaquetários quando comparado com as plaquetas ativadas do grupo salina (Figura 6). A pré-incubação das plaquetas com sc-3095 (1µM) por 3 minutos aumentou 2.1 vezes os níveis de GMPc em plaquetas ativadas dos ratos injetados com salina. O Rottlerin (5 μM) não modificou os níveis intraplaquetários de GMPc no grupo salina (Figura 6).

Os níveis de GMPc em plaquetas não ativadas dos ratos 6h após injeção de LPS são significativamente maiores do que no grupo onde os ratos foram injetados com salina (aumento de 5.2 vezes). A ativação das plaquetas do grupo LPS 6h aumentou 73% os níveis de GMPc quando comparado à plaquetas não ativadas, as quais não foram modificadas pela pré-incubação com sc-3095. Por outro lado, o Rottlerin preveniu o aumento dos níveis de GMPc em plaquetas ativadas do grupo LPS 6h (Figura 6).



Figura 6 – Efeito da inibição da PKCδ ou PKCε nos níveis de GMPc em plaquetas de ratos tratados com LPS. 1) O sangue dos ratos injetados com salina ou após 6h da injeção com LPS (1mg /kg) foi coletado. Em alguns experimentos as plaquetas lavadas (1,2x10⁸ plaquetas/ml) foram pré-incubadas por 3 min com o inibidor da PKCδ, Rottlerin (5µM) ou com o inibidor da PKCε, sc-3095 (1µM). 2) Os níveis de GMPc foram determinados após 2 min de ativação plaquetária com ADP 5µM. * P <0,05 comparado com as plaquetas não ativadas do grupo salina. #P <0,05 comparado com as plaquetas não ativadas do grupo LPS 6h.+ P<0,05 comparado com as plaquetas ativadas com ADP do grupo LPS 6h. N=4.

4.4 Efeito da inibição da PKCδ ou PKCε na fosforilação da VASP em plaquetas de ratos injetados com salina ou LPS

A VASP pode ser utilizada como um marcador da ativação de PKG (quando fosforilada no resíduo Ser239). Na figura 7A podemos observar que a ativação de plaquetas com ADP (5µM) do grupo salina leva a um discreto aumento da fosforilação da VASP no resíduo Ser239, o qual não é modificado pela pré-incubação das plaquetas por 3min com Rottlerin (5µM) ou sc-3095 (1µM). Entretanto, nas amostras de plaquetas de ratos tratados com LPS em 6h, é possível observar um aumento significante na fosforilação da VASP no resíduo Ser239 no resíduo Ser239 quando estas células são estimuladas com ADP (5µM). Este efeito é revertido pelo inibidor da PKCδ, Rottlerin (5µM), enquanto o inibidor de PKCε sc-3095, não modifica este efeito (Figura 7B).

Em ratos 48h após a injeção de LPS, a ativação das plaquetas com ADP também aumentou a fosforilação da VASP no resíduo Ser239 (aumento de 2 vezes), apesar do mesmo não ser estatísticamente significativo (Figura 7C). A pré-incubação das plaquetas com sc-3095 reduziu significativamente o aumento da fosforilação da VASP (redução de 3 vezes). Diferente do observado em plaquetas ativadas de ratos injetados com LPS em 6h, a inibição da PKCō não alterou a magnitude da fosforilação da VASP no grupo LPS 48h (Figura 7C).



Figura 7 – Efeito da inibição da PKCδ ou PKCε na fosforilação da VASP em plaquetas de ratos injetados com salina ou LPS. Ratos foram injetados com LPS (1 mg/kg) ou salina (Painel A) e depois de 6h (Painel B) ou 48h (Painel C) horas o sangue foi coletado. As amostras de plaquetas ativadas ou não com ADP (5 µM) tiveram a reação interrompida pelo acréscimo de tampão Laemmle (3:1). As amostras (25µL/well) foram corridas em gel SDS-PAGE 10% e analisadas por Western bloting usando os anticorpos anti-β-actina e anti-fosfo-(Ser239)-VASP. Em alguns experimentos as plaquetas foram pré-incubadas por 3 min com rottlerin ou sc-3095 antes da ativação com ADP. Os resultados são representativos pela razão das densitometrias da banda imunorreativa para p-(Ser239)-VASP e β-actina. Bandas imunorreativas para β-actina e p-VASP representativas estão apresentadas sobre as barras. *n*=6 diferentes animais.* P<0.05 comparado com plaquetas não ativadas do grupo salina. # P<0,05 comparado com plaquetas ativadas com ADP do grupo LPS 6h. + P<0,05 comparado com as plaquetas ativadas com ADP do grupo LPS 48h.

4.5 Efeito da inibição da PKC δ ou PKCε na agregação plaquetária de ratos tratados com LPS e NAC.

O tratamento dos ratos com NAC (150mg/kg, i.p.) 30 minutos após a injeção de salina não modificou a agregação induzida por ADP (5µM), na ausência ou presença de Rottlerin 5µM (Figura 8). Entretanto, a NAC preveniu a redução da agregação causada pela pré-incubação de plaquetas com sc-3095 (1µM, 3 min) do grupo salina (Figura 8). O efeito inibitório do LPS em 6h de agregação induzida por ADP foi abolido por NAC. A pré-incubação de plaquetas com Rottlerin (5µM) aumentou 23% a agregação de ratos tratados com LPS e NAC. A agregação do grupo LPS e NAC não foi modificada pela pré-incubação das plaquetas com sc-3095 (1µM).



Figura 8 – Efeito da inibição da PKCδ ou PKCε na agregação plaquetária de ratos tratados com LPS e NAC. Ratos foram injetados com salina (Painel A) ou LPS (1 mg/kg) (Painel B) e após 30min receberam uma única injeção i.p. de NAC (150mg/kg). Após 6h o sangue foi coletado e as plaquetas estimuladas com ADP (5µM). Em alguns experimentos as plaquetas foram pré-incubadas por 3min com rottlerin (5µM) ou sc-3095 (1 µM) antes da adição de ADP. A curva foi monitorada por 10 minutos e os resultados mostrados são referentes a media \pm EPM (*n*=4). +P<0,05 comparado ao grupo salina na ausência dos inibidores de PKC. #*P*<0,05 comparado com LPS.

4.6 Fosforilação da AKT em plaquetas de ratos tratados com LPS e NAC

Os ensaios de Western blot mostraram que a fosforilação de AKT no resíduo Thr308 no grupo onde os ratos foram injetados com LPS e NAC foi semelhante em plaquetas não ativadas e ativadas com ADP (5µM) (Figura 9). Quando comparamos estes resultados com os da figura 5D, observamos que na verdade a NAC preveniu o aumento da fosforilação de AKT em plaquetas ativadas de ratos tratados somente com LPS.

A NAC não modificou a fosforilação de AKT em plaquetas ativadas quando comparada a plaquetas não ativadas do grupo salina. A fosforilação da AKT também foi semelhante em plaquetas não ativadas e ativadas de ratos que foram injetados somente com salina (Figura 5A).



Figura 9 – Fosforilação da AKT no resíduo Thr308 em plaquetas de ratos tratados com

LPS e NAC. Ratos foram injetados com salina ou LPS (1 mg/kg) e após 30 minutos receberam uma única injeção de NAC (150mg/kg, i.p.). Após 6 horas o sangue foi coletado. Foi adicionado tampão Laemmle (3:1) à suspensão plaquetária (4x10⁸) ativada ou não com ADP (5µM). As amostras (25µL/poço) foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE 10%) e analisadas por Western Blotting usando os anticorpos anti-AKT e anti-P(Thr308)-AKT. Os resultados são apresentados como a razão das densitometrias das bandas imunorreativas para P(Thr308)-AKT e AKT não fosforilada. Os resultados mostrados são referentes a media ± EPM (*n*=5 diferentes animais).

4.7 Fosforilação da VASP no resíduo Ser239 em plaquetas de ratos tratados com LPS e NAC

A fosforilação da VASP no resíduo Ser239 foi 30% maior em plaquetas ativadas (ADP 5μM) do que em plaquetas não ativadas, tanto no grupo onde os ratos foram injetados com salina e NAC, como naquele injetado com LPS e NAC (Figura 10). Com efeito, quando comparamos os resultados da Figura 10 com os apresentados na Figura 7B, podemos observar que a NAC previne o aumento da fosforilação da VASP em plaquetas ativadas do grupo onde os ratos foram injetados somente com o LPS.



Figura 10 – Fosforilação da VASP no resíduo Ser239 em plaquetas de ratos tratados com LPS e NAC. Ratos foram injetados com salina ou LPS (1 mg/kg) e após 30 minutos receberam uma única injeção de NAC (150mg/kg, i.p.). Após 6 horas o sangue foi coletado. Foi adicionado tampão Laemmle (3:1) à suspensão plaquetária (4x10⁸) ativada ou não com ADP (5μM). As amostras (25 μL/poço) foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE 10%) e analisadas por Western Blotting usando os anticorpos anti-AKT e anti-fosfo-(Thr308)-AKT. Os resultados são apresentados como a razão das densitometrias das bandas imunorreativas para P-(Thr308)-AKT e AKT não fosforilada. Os resultados mostrados são referentes a media ± EPM (*n*=5 diferentes animais).

5 DISCUSSÃO

O LPS pode interagir com várias células e levar a diferentes efeitos. Em 2005 foi descrito pela primeira vez a presença do receptor funcional de LPS, "toll-like receptor-4" (TLR-4), em plaquetas (Andonegui et al, 2005). Os efeitos do LPS em plaquetas ainda são extremamente controversios e, portanto, são necessários ainda muitos estudos na tentativa de melhor elucidar os mecanismos envolvidos na interação desses elementos e LPS.

Alguns grupos mostraram que o LPS leva a ativação plaquetária, enquanto outros mostraram um efeito inibitório. Já foi descrito que a incubação de plaquetas com LPS é capaz de induzir a liberação do conteúdo dos grânulos densos e alfa, bem como de levar à síntese de TxA₂ (Young et al,1996; Wachowicz et al, 1998; Saluk-Juszczak et al, 1999; Saluk-Juszczak et al, 2005). Além disso, foi mostrado que o LPS potencializa a agregação induzida por trombina e colágeno em baixas concentrações (Zhang et al, 2009). O tratamento de animais com LPS também leva a um aumento da adesão de plaquetas a vênulas do intestino de camundongo (Cerwinka et al, 2002; Katayama et al, 2002).

Por outro lado, já foi mostrado que a agregação de plaquetas humanas e de coelho induzida por colágeno é inibida por LPS de *E. coli*, sendo este efeito é acompanhado de aumento de GMPc e inibição da mobilização de Ca²⁺ intracelular (Sheu et al, 1998 e 1999). E ainda, a agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno, tromboxano e ácido araquidônico está diminuída em pacientes com sepse (Yaguchi et al, 2004).

O nosso grupo demonstrou que a incubação de plaquetas humanas com LPS de *E. coli* inibe a adesão plaquetária ao fibrinogênio envolvendo a inibição do influxo de Ca²⁺, mas de forma independente da geração de GMPc ou da redução da ativação do receptor de fibrinogênio GPIIb/IIIa (Morganti et al, 2010). Além disso, demonstramos que o tratamento de ratos com LPS inibe a adesão de plaquetas ativadas com trombina ao fibrinogênio (Casarin et al. 2011). Ainda, o tratamento de ratos com LPS inibe a agregação de plaquetas ativadas por ADP (Lopes-Pires et al, 2012). Neste mesmo trabalho, mostramos também que há um aumento da produção de EROs nas plaquetas, principalmente via ativação de NADPH (Lopes-Pires, 2012).

Uma vez que vários estudos têm apontado as plaquetas como importantes células na sepse, utilizamos um modelo clássico de sepse experimental, onde ratos são tratados com uma dose sub-letal de LPS, na tentativa de melhor elucidar as vias de sinalização envolvidas na modulação da atividade plaquetária neste quadro clínico. A dose de LPS (1 mg/kg) padronizada pelo nosso grupo é capaz de induzir quadro inflamatório no animal, comprovado pelo aumento de TNF-α plasmático, além de causar significativa trombocitopenia (Lopes-Pires et al, 2012). Os resultados obtidos pelo nosso grupo mostram que no tempo de 6 horas após a injeção do LPS inicia-se a redução no número de plaquetas circulantes, assim como da agregação, entretanto, em 48 horas tais parâmetros passam a ser reestabelecidos (Lopes-Pires et al, 2012).

No presente trabalho mostramos que a agregação plaquetária induzida por ADP de ratos 6h após a injeção de LPS está inibida, sendo este efeito modulado pela PKCō. Também mostramos que o efeito inibitório do LPS na agregação plaquetária é acompanhado do aumento da fosforilação de AKT, aumento dos níveis de GMPc e aumento da ativação da PKG. Todos estes efeitos são modulados pela PKCō, mas não pela PKCɛ. Por outro lado, o efeito inibitório do LPS em 48h na agregação plaquetária não é dependente da PKCō ou PKCɛ. Ainda, em 48h também mostramos que estas duas isoformas de PKC não modulam a fosforilação da AKT, entretanto, a PKCɛ aumenta a fosforilação da VASP. No grupo controle, ou seja, naquele onde os ratos foram injetados com salina, a PKCō não parece modular a agregação plaquetária, enquanto a PKCɛ aumenta a agregação plaquetária e reduz os níveis de GMPc em plaquetas.

Sabe-se que a PKC possui em sua família onze diferentes isoformas, das quais oito já foram descritas em plaquetas (Heemskerk et al, 2011). Dentre as que já foram relatadas em plaquetas temos a PKC α e PKC β (convencionais), PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ (não-convencionais) e PKC ζ , PKCI (atípicas), embora apenas a presença e não a função das PKCs atípicas tenha sido descrita (Baldassare et al, 1992; Wang et al, 1995; Yacoub et al, 2006; Pears et al, 2008; Bynagari et al, 2009; Gilio et al, 2010; Harper and Poole, 2010).

Trabalhos mostram que a PKCδ regula a agregação plaquetária *In vitro* induzida por colágeno em plaquetas humanas (Pula et al, 2006; Gilio et al 2010), além de ser uma quinase sensível ao estresse oxidativo (Zhang et al, 2007).

Já foi reportado que a PKC possui um papel importante nos efeitos desencadeados pelo LPS (Lynn et al, 1992). A PKC está envolvida na produção de

IL-1β e TNF-α por monócitos e macrófagos na presença e LPS (Chung et al, 1992; Shapira et al, 1994). Em 1997, Shapira e colaboradores mostraram que a PKCε era a principal isoforma desta quinase envolvida na secreção de macrófagos na presença de LPS.

Desta forma, decidimos estudar o papel das PKCδ e PKCε na agregação plaquetária de ratos injetados com salina ou LPS.

Os nossos resultados mostram que a PKC e modula positivamente a agregação induzida por ADP de ratos injetados com salina. Alguns trabalhos mostram que a PKC₂ reduz a secreção granular, a fosforilação de ERK, a concentração de Ca²⁺ intracelular, a síntese de TxA₂ e a agregação de plaquetas de camundongos ativadas por ADP (Unsworth et al, 2011; Bynagari-Settipalli et al, 2012). Entretanto, já foi demonstrado também que a PKCE aumenta a agregação e a secreção de grânulos de plaquetas de camundongos ativadas com colágeno (Pears et al, 2008). Ainda, Unsworth e colaboradores (2012) mostraram que em camundongos deficientes em PKCε ou PKCδ a agregação ou ligação das plaquetas ao fibrinogênio tem o mesmo perfil que em animais selvagens, entretanto, guando há uma redução tanto da PKCE quanto da PKCδ ocorre redução da agregação induzida por colágeno. Portanto, podemos concluir que há ainda muita controvérsia sobre o papel da isoformas PKCo e PKC_E na agregação. É interessante notar que os nossos resultados mostram que a inibição da PKC não somente reduz a agregação, como também aumenta os níveis intraplaquetários de GMPc. Entretanto, com base no nosso desenho experimental, não é possível assegurar que a redução da agregação pela inibição da PKCE é decorrente somente do aumento dos níveis desse nucleotídeo cíclico.

Após 6 horas da injeção de LPS a agregação plaquetária, que se apresenta diminuída quando estimulada com ADP, é revertida na presença do Rottlerin, o que indica que a PKCδ tem um papel importante na modulação negativa da agregação plaquetária. A modulação negativa da agregação pela PKCδ já havia sido descrita em condições fisiológicas (Chari et al, 2009; Gilio et al, 2010), mas não em estado de alto estresse oxidativo e sepse experimental.

Recentemente, resultados publicados pelo nosso grupo mostraram que a inibição da agregação 6h após a injeção de LPS é reduzida pela inibição não seletiva da PKC, da guanilil ciclase solúvel, PKG, AKT, mas não pela PI3K (Lopes-Pires et al, 2015). Desta forma, para compreender quais os possíveis mecanismos "downstream"

da PKCδ foram realizados experimentos para determinar os níveis de fosforilação da AKT, VASP e níveis de GMPc em plaquetas na presença do inibidor de PKCδ, rottlerin.

Já está bem estabelecido que a AKT é ativada pela PI3K (Woulfe et al, 2010; Risso et al, 2015), entretanto, trabalhos mostram que AKT também pode ser ativada pela PKC (Kawakami et al, 2004, Kumar et al, 2009, Choi et al, 2013). A PKCβ ativa a AKT em mastócitos (Kawakami et al, 2004) enquanto a PKCδ estimula a AKT de células pulmonares (Kumar et al, 2009, Choi et al, 2013).

Para haver completa ativação da AKT, é necessária fosforilação no resíduo Ser473 e Thr308, sendo que o resíduo Thr308 pertence ao domínio catalítico da AKT e o resíduo Ser473 pertence ao domínio regulatório (Risso et al, 2015). O resíduo Ser473 tem sido mais comumente estudado e usado como parâmetro para determinar a ativação da AKT, entretanto grupos vêm mostrando que o resíduo Thr308 também pode predizer a atividade da AKT (Vanhaesebroeck et al, 2000; Vincent et al, 2011).

Como resultados prévios mostraram que o efeito inibitório do LPS em 6h era revertido pela inibição de AKT, mas não da PI3K (Lopes-Pires et al, 2015), no presente trabalho inferimos que a AKT poderia ser ativada pela PKC. Na verdade, em ratos 6h após a injeção de LPS observamos um aumento grande da fosforilação da AKT em plaquetas após ativação com ADP, a qual é prevenida pela incubação das plaquetas com rottlerin. Portanto, a fosforilação da AKT no resíduo Thr308 é aumentada pela PKCδ nestas condições.

A síntese de NO, no modelo experimental de sepse onde os ratos são injetados com LPS, é drasticamente aumentada (Baker e Sutton, 1993; Hollenberg et al, 1993). O NO é sintetizado a partir da ativação da enzima óxido sintase (NOS) cuja atividade enzimática pode ser modulada pela fosforilação de diferentes resíduos de aminoácidos (Dudzinski e Michel, 2007). A fosforilação nos resíduos Ser1177, Ser635 e Ser617 estimula a atividade enzimática da eNOS, enquanto a fosforilação nos resíduos Thr495 e Ser116 é inibitória (Bauer et al, 2003).

Embora muitos autores já tenham comprovado, por diferentes técnicas, desde 1990 até os dias de hoje a presença da eNOS em plaquetas (Radomski et al, 1990; Fleming et al, 2003; Signorello et al 2011; Cozzi et al, 2015), existem sérias controvérsias a este respeito. Em 2008, Gambaryan e colaboradores, utilizando amostras de plaquetas muito purificadas, relataram que estas células não possuem a NOS. Entretanto, estes resultados são ainda muito discutidos e, recentemente alguns grupos, utilizando diferentes técnicas, mostraram a presença de eNOS em plaquetas (Apostoli et al, 2014; Cozzi et al, 2015).

Como alguns trabalhos mostraram que a atividade da eNOS pode ser modulada pela AKT ou PKC através de sua fosforilação (Signorello et al, 2011; Ishida et al, 2014; Zheng et al, 2016), decidimos investigar a ativação da eNOS no grupo salina ou injetado com LPS. Entretanto, não conseguimos detectar, através de ensaios de Western Blot, a presença da eNOS, fosforilada ou não, nas nossas amostras. Mas ainda acreditamos na presença da mesma em plaquetas, uma vez que conseguimos detectar alterações nos níveis de GMPc nestas células dependendo do desenho experimental utilizado. Por esta razão, decidimos determinar a ativação da eNOS em plaquetas, indiretamente através da determinação dos níveis de GMPc.

Nossos resultados mostram claramente que plaquetas de ratos 6h após a injeção de LPS apresentam um aumento significativo dos níveis de GMPc quando comparado ao grupo salina, os quais são significativamente reduzidos pela incubação de plaquetas com rottlerin. Estes resultados indicam que a PKCδ diretamente, ou através da AKT, leva ao aumento de GMPc que, por sua vez, contribui para a inibição da agregação plaquetária. Já foi mostrado que a AKT em plaquetas, estimuladas com insulina, fosforila a eNOS no resíduo Ser1177 aumentando assim sua atividade (Fleming et al, 2003).

Para estudar o envolvimento da PKG no efeito inibitório do LPS 6h na agregação plaquetária determinamos a fosforilação da VASP no resíduo Ser239 que é um sítio específico para PKG (Tao et al, 2012; Adderley et al, 2012). As amostras controle, provenientes do grupo salina, não apresentaram diferenças significantes na fosforilação da VASP, já as amostras LPS 6h apresentaram fosforilação elevada da VASP, mesmo nas plaquetas não estimuladas, possivelmente pela produção excessiva de NO que ocorre na presença de LPS (Sheu et al, 1998 e 1999; Casarin et al, 2011). Quando as plaquetas do grupo LPS 6h são estimuladas, a fosforilação da VASP é maior do que quando não estimuladas e, na presença do rottlerin é possível notar significante redução da fosforilação desta proteína. Alguns trabalhos já mostraram que a PKCō em plaquetas leva a ativação de eNOS e aumento da fosforilação da VASP (Munoz et al, 2012; Pula et al, 2006). Portantanto, nossos resultados corroboram para a hipótese que a via NO-GMPc-PKG são mecanismos downstream à ativação da PKCō e, participam do efeito inibitório do LPS 6h na agregação induzida por ADP. Por outro lado, a PKCɛ não exerceu nenhum efeito

modulatório na fosforilação da VASP nas amostras do grupo LPS 6 horas, descartando assim a participação desta isoforma na inibição da agregação plaquetária.

O índice de contaminação das amostras (Tabela 1) coletadas foi calculado, e quantidade de outros tipos celulares nas amostras controle e 6 horas foi inferior a 2%, e descartamos que ocorra interferência significativa de outro tipo celular além de plaquetas.

Como já relatado, a PKCδ é uma isoforma de PKC sensível ao estresse oxidativo (Greene et al, 2014; Quiao et al, 2016). Em trabalho prévio, foi mostrado que plaquetas de ratos 6h após a injeção de LPS há um aumento significativo de EROs (Lopes-Pires et al, 2012), o que poderia levar a maior ativação da PKCδ. Corroborando com esta hipótese mostramos que a NAC previne o aumento da fosforilação de AKT e VASP, bem como reduz o efeito inibitório do LPS em 6h na agregação plaquetária. Além disso, o rottlerin não altera nenhum efeito do LPS 6h em plaquetas de ratos também tratados com NAC. A NAC é um antioxidante, capaz de se difundir pelas membranas celulares, que interage diretamente com EROs e é precursora da síntese de glutationa, um antioxidante natural do organismo (Aruoma et al, 1989; Pastor et al, 1997). Em 2012, Lopes-Pires e colaboradores mostraram que o tratamento de ratos com NAC era capaz de prevenir o aumento de EROs observado em plaquetas de animais previamente injetados com LPS.

Também mostramos que a contaminação da suspensão plaquetária com leucócitos é muito pequena, portanto, concluímos que todos os resultados descritos no presente trabalho se referem exclusivamente às plaquetas.

É interessante observar que a inibição da agregação de ratos 48h após a injeção de LPS não é mediada pelas mesmas vias envolvidas no efeito inibitório do LPS em 6h. Ou seja, não observamos aumento da fosforilação de AKT no resíduoThr308 e o rottlerin não modifica a agregação ou a fosforilação de VASP de plaquetas de ratos injetados com LPS 48h.

6 CONCLUSÃO

A PKCε modula positivamente a agregação induzida por ADP e negativamente os níveis de GMPc em plaquetas de ratos injetados com salina;

A PKCδ aumenta a ativação da AKT, os níveis de GMPc e a ativação da PKG, contribuindo para inibição da agregação plaquetária 6h após a injeção de LPS;

O efeito inibitório da agregação induzida por ADP 48h após a injeção de LPS independe da PKCδ, PKCε, ou ativação da PKG.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adderley SP, Joshi CN, Martin DN, Tulis DA. **Phosphodiesterases Regulate BAY 41-2272-Induced VASP Phosphorylation in Vascular Smooth Muscle Cells.** Frontiers in Pharmacology. v.7, n.3, 2012.

Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulmé R, Lepage E, Le Gall JR. **Epidemiology of sepsis** and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. Intensive Care Medicine. v.28, n.2, 2002, p.108–121.

Alexander C1, Rietschel ET. **Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity.** Journal of Endotoxin Research. v.7, n.3, 2001, p.167-202.

Amura CR, Kamei T, Ito N, Soares MJ, Morrison DC. **Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins.** Journal of Immunology. v.161, n.5, 1998, p.2552-2560.

Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KVJ, Pate KD, Kubes P. **Platelets Express functional Toll-like receptor-4.** Blood. v.106, n.7, 2005, p.2417-23.

Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B. **Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network.** American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. v.168, n.2, 2003, p.165-172.

Apostoli GL, Solomon A, Smalwood MJ, Winyard PG, Emerson M. **Role of inorganic nitrate and nitrite in driving nitric oxide-cGMP-mediated inhibition of platelet aggregation** *in vitro* **and** *in vivo*. Journal of Thrombosis and Haemostasis. v.12, n.11, 1989, p.1880-1889.

Arderiu G, Diaz-Ricart M, Buckley B, Escolar G, Ordinas A. **Primary arrest of circulating platelets on collagen involves phosphorylation of Syk, cortactin and focal adhesion kinase: studies under flow conditions.** Biochemical Journal. v.364, n.1, 2002; p.65–71.

Aruoma OL, Halliwel B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of Nacetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. Free Radical Biology and Medicine. v.6, n.6, 1989, p.593-597. Badimon L, Vilahur G. Coronary Atherothrombotic Disease: Progress in Antiplatelet Therapy. Revista Epanola de Cardiologia. v. 61, n. 5, 2008, p.501-513.

Balafanova Z, Bolli R, Zhang J, Zheng Y, Pass JM, Bhatnagar A, Tang XL, Wang O, Cardwell E, Ping P. Nitric Oxide (NO) Induces Nitration of Protein Kinase C(PKCɛ), Facilitating PKCɛ Translocation via EnhancedPKCɛ-RACK2 Interactions. The Journal of Biological Chemistry. v.277, N.17, 2002, p.15021–15027.

Balci YI, Acer S, Yagci R, Kucukatay V. Sarbay H, Bozkurt K, Polat A. **N-acetylcysteine supplementation reduces oxidative stress for cytosine arabinoside in rat model**. International Ophthalmology. 2016.

Baldassare JJ, Henderson PA, Burns D, Loomis C, Fisher GJ. **Translocation of protein kinase C isozymes in thrombin-stimulated human platelets. Correlation with 1,2-diacylglycerol levels**. Journal of Biological Chemistry. v.267, n.22, 1992, p.15585-15590.

Baker CH, Sutton ET. Arteriolar endothelium-dependent vasodilation occurs duringendotoxin shock. American Journal of Physiology. v.264, n.4, 1993, p.H1118-H1123.

Bauer PM, Fulton D, Boo YC, Sorescu GP, Kemp BE, Jo H, Sessa WC. Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase. Journal of Biological Chemistry. v.278, n.17, 2003, p.14841-14849.

Bäumer AT, Ten Freyhaus H, Sauer H, Wartenberg M, Kappert K, Schnabel P, Konkol C, Hescheler J, Vantler M, Rosenkranz S. **Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane recruitment of Rac-1 and p47phox is critical for alpha-platelet-derived growth factor receptor-induced production of reactive oxygen species.** Journal of Biological Chemistry. v.283, n.12, 2008, p.7864-7876.

Begonja AJ, Gambaryan S, Geiger J, Aktas B, Pozgajova M, Nieswandt B, Walter U. Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS producton regulates alphallbeta3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. Blood. 2005; 106(8): 2757-60.

Bhattacharyya J, Biswas S, Datta AG. Mode of action of endotoxin: role of free radicals and antioxidants. Curr. Med. Chem. 2004; 11(3):359-68.

Bhavanasi D, Kostyak JC, Swindle J, Kilpatrick LE, Kunapuli SP. **CGX1037 is a novel PKC isoform delta selective inhibitor in platelets.** Platelets. v.26, n.1, 2015.

Bian K, Murad F. Nitric oxide (NO): biogeneration, regulation and relevance to human diseases. Frontiers in Bioscience. v.8, 2003, p.64-78.

Birschmann I, Mietner S, Dittrich M, Pfrang J, Dandekar T, Walter U. **Use of functional highly purified human platelets for the identification of new proteins of the IPP signaling pathway.** Thrombosis Research. v.122, n.1, 2008, p.59-68.

Blockmans D, Deckmyn H, Vermylen J. **Platelet Activation.** Blood Reviews. v.9, n.3, 1995; p.143-156.

Blumberg PM. **Complexities of the Protein Kinase C Pathway.** Molecular Carcinogenisis. v.4, n.5, 1991, p.339-344.

Bochud PY, Calandra T. **Pathogenisis of sepsis: new concepts and implications for future treatment.**BMJ. v.326, 2003, p.262-266.

Bokoch, GM. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. Current Opinion in Cell Biology. v.6, n.2, 1994, p.212-218.

Boldt J, Muller M, Rothe A, Lenzen P, Hempelmann G. **Does continuous heparinization influence platelet function in the intensive care patient?** Intensive Care Medicine. v.23, n.5, 1997, p.567–573.

Boulos C, Jiang H, Balazy M. **Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues.** Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics. v.293, n.1, 2000, p.222-229.

Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebø R, Joø GB, Westvik AB, Kierulf P. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. Journal of Experimental Medicine. v.184, n.1, 1996, p.51-60.

Brewer D. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. British Journal of Haematology. v.133, n.12, 2006; p.251–258.

Brown AS, Moro MA, Masse JM, Cramer EM, Radomski M, Darley-Usmar V. Nitric oxide-dependent and independent effects on human platelets treated with peroxynitrite. Cardiovascular Research. v.40, n.2, 1998, p.380-388.

Buensuceso CS1, Obergfell A, Soriani A, Eto K, Kiosses WB, Arias-Salgado EG, Kawakami T, Shattil SJ. **Regulation of outside-in signaling in platelets by integrin-**

associated protein kinase C beta. Journal of Biology Chemical. v.280, n.1, 2005, p.644-653.

Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. **CAMP- and cGMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation Sites of the Focal Adhesion Vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP) in Vitro and in Intact Human Platelets.** The Journal of Biological Chemist. v.269, n.20, 1994, p.14509-14517.

Butt E, Immler D, Meyer HE, Kotlyarov A, Laass K, Gaestel M. Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by HSP27 mutants. Journal of Biological Chemistry. v.276, n.10, 2001, p.7108-7113.

Bynagari YS, Nagy B Jr, Tuluc F, Bhavaraju K, Kim S, Vijayan KV, Kunapuli SP. **Mechanism of activation and functional role of protein kinase Ceta in human platelets.** Journal of Biological Chemistry. v.284, n.20, 2009, p.13413-13421.

Bynagari-Settipalli YS, Lakhani P, Jin J, Bhavaraju K, Rico MC, Kim S, Woulfe D, Kunapuli SP. **Protein kinase C isoform ε negatively regulates ADP-induced calcium mobilization and thromboxane generation in platelets**. Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology. v.32, n.5, 2012, p.1211-1219.

Cadenas S, Barja G, Poulsen HE, Loft S. **Oxidative DNA damage estimated by oxo8dG in the liver of guinea-pigs supplemented with graded dietary doses of ascorbic acid and alpha-tocopherol.** Carcinogenesis. v.18, n.12, 1997, p.2373-2377.

Casarin AL, Lopes-Pires ME, Morganti RP, Antunes E, Marcondes S. **Reactive** oxygen and nitrogen species modulate the *ex-vivo* effects of LPS on platelet adhesion tofibrinogen. Life Sciences. v.89, 2011, p.21-22.

Castro HC, Nagashima T, Schueler A, Rueff C, Camisasca D, Moreira G, Scovino G, Borges I, Leal M, Filgueira M, Paschoal P, Bernardo V, Bourguinhon S, Rodrigues CR, Santos DO. **Plaquetas: ainda um alvo terapêutico**. BrasPatolMed Lab. v.42, n.5, 2006, p.321-332.

Cathcart MK. **Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis.** Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology. v.24, n.1, 2004, p.23-28.

Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. **Arachidonic acid activates a proton conductance pathway and the Na+/H+ exchanger in platelets**. Biochemical Journal. v.16, 1996, p.567-574.

Cerwinka WH, Cooper D, Krieglstein CF, Feelisch M, Granger DN. Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venule. American Journal of Physiology. v.282, n.3, 2000, p.H1111-H1117.

Chari R, Getz T, Nagy Jr B, Bhavaraju K, Mao Y, Bynagari YS, Murugapan K, Kunapuli SP. **Protein Kinase Co differentially regulates platelet functional responses.** Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology. v.29, n.5, 2009, p.699-705.

Chen F, Yu Y, Haigh S, Johnson J, Lucas R, Stepp DW, Fulton DJ. **Regulation of NADPH Oxidase 5 by protein Kinase C Isoforms.** Plos One. v.9, n.2, 2014.

Choi YH, Jin GY, Li LC, Yan CH. Inhibition of Protein Kinase C Delta Attenuates Allergic Airway Inflammation through Suppression of PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 Alpha/VEGF Pathway. Plos One, v.8, n.11, 2013.

Chung IY, Kwon J, Beneviste EN. **Role of protein kinase C activity in tumor necrosis factor-alpha gene expression.** Involvement at the transcriptional level. Journal of Immunology. v.49, n.12, 1992, p.3894-3902.

Cicala C, Santacroce C, Itoh H, Douglas GJ, Page C. **A Study on rat platelet Responsiveness following Intravenous Endotoxin Administration.** Pharmacology Letters. v. 60, n. 2, 1997, p.31-38.

Clark SR, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nature Medicine. 2007; 13 (4).

Cowan DH, Bowman LS, Fratianne RB, Ahmed F. **Platelet aggregation as a sign of septicemia in thermal injury. A prospective study.** JAMA. v.235, n.12, 1976, p.1230–1234.

Cozzi MR, Guglielmini G, Battiston M, Momi S, Lombardi E, Miller EC, De Zanet D, Mazzucato M, Gresele P, De Marco L. Visualization of nitric oxide production by individual platelets during adhesion in flowing blood. Blood. v.125, n.4, 2015, p.697-705.

Crosby D, Poole AW. **Physical and Functional Interaction between Protein Kinase Cδ and Fyn Tyrosine Kinase in Human Platelets.** The Journal of Biological Chemistry. v.278, n.27, 2003, p.24533–24541.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. **Effects of n-acetylcysteine in a ratmodel of ischemia and reperfusion injury.** Cardiovascular Research. v.47, n.3, 2000, p.537–548.

Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. Laboratory Investigation. v.86, n.1, 2006, p.9–22.

Davis RB, Meeker WR, Mcquarrie DG. Immediate effects of intravenous endotoxin on serotonin concentrations and blood products. Circulation Research. v.8, 1960, p.234–239.

Degendorfer G, Chuang CY, Kawasaki H, Hammer A, Malle E, Yamakura F, Davies MJ. **Peroxynitrite-mediated oxidation of plasma fibronectin.** Free Radical Biology & Medicine. v.16, 2016.

Dias R.G, Negrao C.E, Krieger M.E. Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular e variante genética. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. v.96, n.1, 2011, p.68-75.

Dimmeler S, Fleming I, FissIthaler B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature. v.399, 1999, p.601–605.

Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. Cardiovasc Research. v.75, n.2, 2007, p.247-260.

Elhwuegi AS. The Wonders of Phosphodiesterase-5 Inhibitors: A Majestic History. Annals of Medical and Health Sciences Research. v.6, n.3, 2016, p.139-145.

Falcão FJA, Carvalho L, Chan M, Alves CMR, Carvalho ACC, Caixeta AM. **Receptores Plaquetários P2Y**₁₂**: Importância na Intervenção Coronariana Percutânea.** ArquivoBrasileiro de Cardiologia. v.101, n.3, 2013, p.277-282.

Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. Revista da Associação Médica Brasileira. v.43, n.1, 1997, p.370-377.

Flanagan, RJ, Meredith MD. **Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology.** The American Journal of Medicine. v.91, n.3, 1991, p.S131-S139.

Fleming I, Schulz C, Fichtlscherer B, Kemp BE, Fisslthaler B, Busse R. **AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates the insulin-induced activation of the nitric oxide synthase in human platelets.** Journal of Thrombosis and Haemostasis. v.90, n.5, 2003, p.863-871.

Francis SH, Busch JL, Corbi JD. **cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action.** Pharmacological Reviews. v.62, n.3, 2010, p.252-563.

Freedman JE. Oxidative Stress and Platelets. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2008; 28(3): s11-s16.

Gachet C. **ADP Receptors of Platelets and their Inhibition**. Journal of Thrombosis and Haemostasis. v.86, n. 1, 2001, p.222–232.

Galley HF, Davies MJ, Webster NR. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. Critical Care Medicine. v.24, n.10, 1996, p.1649-1653.

Gambaryan S, Kobsar A, Hartmann S, Birschmann I, KuhlencordtPJ, Muller-Esterl W, Lohmann SM, Walter U. **NO-synthase-/NO-independent regulation of human and murine platelet solubleguanylyl cyclase activity**. Journal of Thrombosis and Haemostasis. v.6, n.8, 2008, p.1376–1384.

Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. **Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome.** Intensive Care Medicine. v.23, n.4, 1997, p.379–385.

Gawaz M, Langer H, May A.E. **Platelets in inflammation and atherogenesis.** Journal of Clinical Investigation. v.115, n.12, 2005.

Gianni D, Bohl B, Courtneidge SA, Bokoch GM. The involvement of the tyrosine kinase c-Src in the regulation of reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase-1. Molecular Biollogy of the Cell. v.19, n.7, 2008, p.2984-2994.

Gilligan DM, Sarid D, Weese J. Adducin in platelets: activation-induced phosphorylation by PKC and proteolysis by calpain. Blood, v.99, n.7, 2002.

Gilio K, Harper MT, Cosemans JMEM, Konopatskaya O, Munnix ICA, Prinzen L, Leitges M, Liu Q, Molkentin JD, Heemskerk JWM, Poole AW. Functional Divergence of Platelet Protein Kinase C (PKC) Isoforms in Thrombus Formation on Collagen. The Journal of Biological Chemistry. v.285, n.30, 2010, p.23410-23419.

Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, Takayama K, Raetz CR. Lipid A-like Molecules That Antagonize the Effects of Endotoxins on Human Monocytes. The Journal of Biological Chemistry. v.266, n.29, 1991, 19490-19498.

Gopalakrishna R, Jaken S. **Protein Kinase C Signaling and Oxidative Stress.** Free Radical Biology & Medicine. v.28, n.9, 2000, p.1349–1361.

Greene MW, Burrington CM, Lynch DT, Davenport SK, Johnson AK, Horsman MJ, Chowdhry S, Zhang J, Sparks JD, Tirrell PC. Lipid metabolism, oxidative stress and cell death are regulated by PKC delta in a dietary model of nonalcoholic steatohepatitis. Plos One. v.9, n.1, 2014.

Gresele P1, Agnelli G. **Novel approaches to the treatment of thrombosis.** Trends Pharmacology Science. v.23, n.1, 2002, p.25-32.

Griendling K K, FitzGerald G A. Oxidative Stress and Cardiovascular Injury Part I: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS. Circulation. v.108, n.16, 2003, p.1912–1916.

Guidetti G.F, Canobbio I, Torti M. **PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis.** Advances in Biological Regulation. v.59, 2015, p. 36-52.

Haimovich B, Regan C, DiFazio L, Ginalis E, Ji P, Purohit U, Rowley RB, Bolen J, Greco R. **The FcgammaRII receptor triggers pp125FAK phosphorylation in platelets.** Journal of Biology Chemical. v.271, n.27, 1996, p.16332-16337.

Harbeck B, Huttelmaier S, Schulter K, Jockush BM, Illenberger S. **Phosphorylation** of the Vasodilator-stimulated Phosphoprotein Regulates Its Interaction with Actin. The Journal of Biological Chemistry. v.275, n.40, 2000, p.30817-30825.

Harper MT, Poole AW. **Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation.** Journal of Thrombosis and Haemostasis. v.8, n.3, 2010, p.454-462.

Hechler B., Gachet C. **P2 receptors and platelet function.** Purinergic Signalling. v.7, n.3, 2011, p.293–303.

Heemskerk JW, Harper MT, Cosemans JM, Poole AW. **Unravelling the different functions of protein kinase C isoforms in platelets.** FEBS Letters. v.585, n.12, 2011, p.1711-1716.

Hollenberg SM, Cunnion RE, Zimmerberg J. **Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to catecholamines in septic rats.** American Journal of Physiology. v.264, n.2, 1993, p.H660-H663.

Horstrup K, Jablonka B, Hönig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U. **Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition.** European Journal of Biochemistry. v.225, n.1, 1994, p.21-27.

Hua KF, Wang SH, Dong WC, Lin CY, Ho CL, Wu TH. High glucose increases nitric oxide generation in lipopolysaccharide-activated macrophages by enhancing activity of protein kinase C- α/δ and NF- κ B. Inflammation Research. v.61, n.10, 2012, p.1107-1116.

Ibeagha-Awemu EM, Lee J, Ibeagha AE, Zhao X. Bovine CD14 characterization and relationship between polymorphisms and surface expression on monocytes and polymorphonuclearneutrophilis. BMC Genetics. v.9, 2008.

Ishida K, Taguchi K, Matsumoto T, Kobayashi T. Activated platelets from diabetic rats cause endothelial dysfunction by decreasing Akt/endothelial NO synthase signaling pathway. Plos One. v.9, n.7, 2014.

Jacob RA. **The Integrated Antioxidant System.** Nutrition Research. v.15, n.5, 1995, p.755-766.

Jayachandran M, Brunn JG, Karnicki K, Miller RS, Owen WG, Miller VM. In vivo of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk. Journal of AppliedPhysioloogy. v.102, n.1, 2007, p.429-433.

Jean-Baptiste E. **Cellular Mechanisms in Sepsis.** Journal Intensive Care Medicine. v.22, n.2, 2007, p.63-72.

Jung SM, Moroi M. **Platelet Glycoprotein VI.** Advances in experimental medicine and biology. v.640; Springer, 2008.

Kamath S, Blann AD, Lip GYH. **Platelet activation: assessment and quantification.** European Heart Journal. v.22, n.17, 2001, p.1561–1571.

Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. **The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure.** Molecular Medicine Today. v.5, n.3, 1999, p.123-32.

Katayama T, Ikeda Y, Handa M, Tamatani T, Sakamoto S, Ito M, Ishimura Y, Suematsu M. Immunoneutralization of glycoprotein Ibalpha attenuates endotoxininducedinteractions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo. Circulation Research. v.86, n.10, 2000, p.1031-1037.

Kawakami Y, Nishimoto H, Kitaura J, Maeda-Yamamoto M, Kato RM, Littman DR, Leitges M, Rawlings DJ, Kawakami T. **Protein kinase C βII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion.** Journal of Biological Chemistry. v.279, n.46, 2004, p.47720–47725.

Keen RR, Stella L, Flanigan DP, Lands WE. **Differential detection of plasma hydroperoxides in sepsis.** Critical Care Medicine. v.19, n.9, 1991, p.1114-1119.

Kim JJ, Lorenz R, Arold ST, Reger AS, Sankaran B, Casteel DE, Herberg FW, Kim C. Crystal Structure of PKG I:cGMP Complex Reveals a cGMP-Mediated DimericInterface that Facilitates cGMP-Induced Activation. Structure. n.24, 2016, p.1-11.

Kim YA, Kim MY, Jung YS. Glutathione Depletion by L-Buthionine-S,R-Sulfoximine Induces Apoptosis of Cardiomyocytes through Activation of PKC- δ . Biomolecules & Therapeutic. v. 21, n.5, 2013, p.358-63.

Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ. **Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships.** Current Medicinal Chemistry. v.12, n.22, 2005, p.2601-2623.

Krause KH. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. Experimental Gerontology. v.42, n.4, 2007, p.256-262.

Kroner C, Eybrechts K, Akkerman JW. **Dual regulation of platelet protein kinase B.** Journal of Biological Chemistry. v.275, n.36, 2000, p.27790-27798.

Krötz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Klauss V, Pohl U. **NAD(P)H-oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment.** Blood. v.100, n.3, 2002p.917-924.

Kumar S, Sud N, Fonseca FV, Hou Y, Black SM. Shear stress stimulates nitric oxide signaling in pulmonary arterial endothelial cells via a reduction in catalase activity: role of protein kinase Cδ. Lung Cellular and Molecular Physiology. v.298, 2009, p.L105–L116.

Lamson DW, Brignall MS. The use of nebulized glutathione in the treatment of emphysema: a casereport. Alternative Medicine Review. v.5, n.5, 2000, p.429-431.

Lavoie S, Murray MM, Deppen P, Knyazeva MG, Berk M, Boulat O, Bovet P, Bush AI, Conus P, Copolov D, Fornari E, Meuli R, Solida A, Vianin P, Cuénod M, Buclin T, Do

KQ. Glutathione precursor, Nacetyl-cysteine, improves mismatch negativity in schizophrenia patients. Neuropsychopharmacology. v.33, n.9, 2008, p.2187-2199.

Lawrence DW, Pryzwansky KB. The Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Is Regulated by Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase During Neutrophil Spreading. The Journal of Immunology. v.166, n.9, 2001, p.5550-5556.

Léon C1, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich A, LeMeur M, Cazenave JP, Gachet C. **Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y1 receptor–null mice.** The Journal of Clinical Investigation. v.104, n.12, 1999, p.1731–1737.

Li Z, Xi X, Gu M, Feil R, Ye RD, Eigenthaler M, Hofmann F, Du X. **A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation.** Cell. v.112, n.1, 2003, p.77-86.

Lopes-Pires ME, Casarin AL, Pereira-Cunha FG, Lorand-Metze I, Antunes E, Marcondes S. Lipopolysaccharide treatment reduces rat platelet aggregation independent of intracellular reactive-oxygen species generation. Plateltes. v.23, n.3, 2012, p.195-201.

Lopes-Pires ME, Naime AC, Almeida Cardelli NJ, Anjos DJ, Antunes E, Marcondes S. **PKC and AKT Modulate cGMP/PKG Signaling Pathway on Platelet Aggregation in Experimental Sepsis.** Plos One. v.10, n.9, 2015.

Loegering DJ, Lennartz MR. **Protein Kinase C and Toll-Like Receptor Signaling.** Enzyme Research. 2011.

Marcondes S, Cardoso MH, Morganti RP, Thomazzi SM, Lilla S, Murad F, De Nucci G, Antunes E. Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: a role for alpha-actinin nitration. Proceedings of the National Academy of Sciences. v.103, n.9, 2006, p.3434-3439.

Masella R, Di Benedetto R, Varì R, Filesi C, Giovannini C. **Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes.** Journal of Nutritional Biochemistry.v.16, n.10, 2005 p.577-586.

Mayanglambam A, Bhavanasi D, Vijayan KV, Kunapuli SP. **Differential** dephosphorylation of the protein kinase C-zeta (PKCζ) in an integrin αllbβ3dependent manner in platelets. Biochemical Pharmacology. v.82, n.5, 2011, p.505-513. Mazzarello P, Calligaro AL, Calligaro A. **Giulio Bizzozero: a pioneer of cell biology**. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001, n.2, p.776-784.

Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. **Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets.** Journal of Laboratory and Clinical Medicine. v.125, n.3, 1995, p.370-377.

McCuskey R, Urbaschek R, Urbaschek B. **The microcirculation during endotoxemia.** Cardiovascular Research. v.32, n.4, 1996, p752-763.

Michael T, Vanhoutte PM. **Cellular signaling and NO production.** Pflugers Archiv - European Journal of Physiology. v.459, n.6, 2010, p.807-816.

Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S. **The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase**. Current Biology. v.9, n.15, 1999, p.845–848.

Misztal T, Przesław K, Rusak T, Tomasiak M. **Peroxynitrite--altered platelet mitochondriaa new link between inflammation and hemostasis.** Thrombosis Research. v.131, n.1, 2013, p.17-25.

Misztal T, Rusak T, Tomasiak M. **Peroxynitrite may affect clot retraction in human blood through the inhibition of platelet mitochondrial energy production.** Thrombosis Research. v.133, n.3, 2014, p.402-411.

Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. **Insulin-stimulated activation of eNOS** is independent of Ca2+ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). Journal of Biological Chemistry. v.276, n.32, 2001, 30392-30398.

Monti M, Donnini S, Giachetti A, Mochly-Rosen D, Ziche M. **δPKC inhibition or εPKC** activation repairs endothelial vascular dysfunction by regulating eNOS posttranslational modification. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. v.48, n.4, 2010, p.746-756.

Morganti RP, Cardoso MH, Pereira FG, Lorand-Metze I, De Nucci G, Marcondes S, Antunes E. **Mechanisms underlying the inhibitory effects of lipopolysaccharide on human platelet adhesion**. Platelets. v.21, n.4, 2010, p.260-269.

Moriya S, Kazlauslas A, Akimoto Z, Hirai SI, Mizuno K, Takenawa T, Fukui Y, Watanabe Y, Ozaki S, Ohno S. Platelet-derived growth factor activates protein kinase Cɛ through redundant and independent signaling pathways involving phospholipase Cy or phosphatidylinositol 3-kinase. Cell Biology. v.93, 1996, p.151-155.

Moro MA, Darley-Usmar VM, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Radomski MW, Moncada S. **Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets.** Proceedings of the National Academy of Sciences. v.91, n.14, 1994, p.6702-6706.

Mount PF, Kemp BE, Power DA. **Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multisite eNOS phosphorylation.** Journal of Molecular and Cellular Cardiology. v.42, n.2, 2007, p.271-279.

Munoz YC, Gomes GI, Moreno M, Solis CL, Valladares LE, Velarde V. Dehydroepiandrosterone Prevents the Aggregation of Platelets Obtained from Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes Mellitus through the Activation of the PKC/eNOS/NO Pathway. Hormone and Metabolic Research. v.44, n.8, 2012, p.625–631.

Muscella A, Vetrugno C, Antonaci G, Cossa LG, Marsigliante S. **PKC-δ/PKC-αactivity balance regulates the lethal effects of cisplatin.** Biochemical Pharmacology. v.98, n.1, 2015, p.29-40.

Naseem KM. **The role of nitric oxide in cardiovascular diseases**. Molecular Aspects of Medicine. v.26, 2005, p.33-65.

Neo BH, Kandhi S, Ahamd M, Wolin MS. **Redox Regulation of Guanylate Cyclase** and Protein Kinase G in Vascular Responses to Hypoxia. Respiratory Physiology & Neurobiology. v.174, n.3, 2010, p.259-264.

O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin Cytoplasmic Domains Mediate Inside-Out Signal Transduction. Journal of Cell Biology. v. 124, n. 6, 1994, p.1047-1059.

Papazoglu C, Ang JR, Mandel M, Basak P, Jesmajian S. **Acetaminophen overdose associated with double serum concentration peaks.** J Community Hosp Intern Med Perspect. v.5, n.6, 2015.

Parise LV. Integrin αIIbβ3 signaling in platelet adhesion and aggregation. Current Opinion in Cell Biology, v.11, n.5, 1999, p.597–601.

Pastor A, Collado PS, Almar M, Gonzáles-Gallego J. **Microsomal function in biliary obstructed rats: effects of S-adenosyl-methionine.** Journal of Hepatology. v.24, 1996, p.353-359.

Pears CJ, Thornber K, Auger JM, Hughes CE, Grygielska B, Protty MB, Pearce AC, Watson SP. Differential roles of the PKC novel isoforms, PKCδ and PKCε, in mouse and human platelets. Plos One. v.3, n.11, 2008.

das TN, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert SM, Vogel SN. **CD11b/CD18** acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. Journal of Immunology. v.166, n.1, 2001, p.574-581.

Pernerstorfer T, Stohlawetz P, Hollenstein U, Dzrilo L, Eichler H.G, Kapiotis S, Jilma B, Speiser W. Endotoxin-Induced Activation of the Coagulation Cascade in Humans Effect of Acetylsalicylic Acid and Acetaminophen. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. v.19, n.10, 1999, p.2517-2523.

Ping P, Takano H, Zhang J, Tang X-L, Qui Y, Li RCX, Banerjee S, Dawn B, Balafonova Z, Bolli R. Isoform-Selective Activation of Protein Kinase C by NitricOxide in the Heart of Conscious Rabbits. Circulation Research. v.84, n.5, 1999, p.587-604.

Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Santos LK, Dickey DM. **Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications.** Handbook of Experimental Pharmacology. v.191, 2009, p.341-366.

Pula G, Schuh K, Nakayama K, Nakayama KI, Walter U, Poole AW. **PKCδ regulates** collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation. Blood. v.108, n.13, 2006, p.4035-4044.

Quiao H, Chen H, Dong Y, Ma H, Zhao G, Tang F, Li Z. **Polydatin Attenuates H2O2-Induced Oxidative Stress via PKC Pathway.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016.

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. **An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v.87, n.7, 1990, p.5193-5197.

Raftos JE, Whillier S, Chapman BE. **Kineties of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. v.39, n.9, 2007, p.1698-1706.

Redondo PC, Jardin I, Hernández-Cruz JM, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Hydrogen peroxide and peroxynitrite enhance Ca²⁺ mobilization and aggregation in platelets from type 2 diabetic patients. Biochemical Biophysical Research Communications. v.333, n.3, 2005, p.794-802.

Ribeiro, A.M.; Moreira, J.L.B. Epidemiologia e etiologia da sepse na infância. Jornal de Pediatria. v.75, n.1, 1999, p.39-44.

Risso G, Blaustein M, Pozzi B, Mammi P, SrebowA. **Akt/PKB: one kinase, many modifications.** Biochemical Journal. V.468, 2015, p.203-214

Robbins J, Stetson CA Jr, **An effect of antigen-antibody interaction on blood coagulation**. The Journal of Experimental Medicine. v.109, n.1, 1959, p.1-8.

Rosado JA, Sage SO. **Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets.** Journal of Physiology. v.529, 2000, p.159-169.

Roy B, Garthwaite J. **Nitric oxide activation of guanylyl cyclase in cells revisited.** Proceedings of the National Academy of Sciences. v.103, n.32, 2006, p.12185-12190.

Saluk-Juszczak J, Wachowicz B, Kaca W.**Stimulatory effects of endotoxin on the platelet secretory process.** Microbios. v.99, n.392, 1999, p.45-53.

Saluk-Juszczak J, Wachowicz B, Bald E, Gowacki R.**Effects of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria on the level of thiols in blood platelets.** Current Microbiology. v.51, n.3, 2005, p.153-155.

Sansone RA, Sansone LA. **Getting a Knack for NAC: N-Acetyl-Cysteine.** Innovations in Clinical Neuroscience. v.8, n.1, 2011, p.10-14.

Shapira L1, Sylvia VL, Halabi A, Soskolne WA, Van Dyke TE, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Bacterial Lipopolysaccharide Induces Early and Late Activation of Protein Kinase C in Inflammatory Macrophages by Selective Activation of PKCε. Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 240, n.2, 1997, p.629-634.

Segal AW, Jones OT. Identification of a previously undescribed cytochrome b in human neutrophils and its relationship to phagocytosis-induced oxidase activity [proceedings]. Biochemical Society Transations. v.7, n.1, 1979, p. 187-188.

Semple JW, ItalianoJE, Freedman J. **Platelets and the immune continuum.**Nature Reviews Immunology. v.11, 2011, p.264-274.

Shang F, Zhao L, Zheng Q, Wang J, Xu Z, Liang W, Liu H, Liu S, Zhang L. **Simvastatin** inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiomyocytes: The role of reactive oxygen species. Biochemical and Biophysical Research Communications. v.351, n.4, 2006, p.947-952.

Shapira L, Takashiba S, Champagne C, Amar S, Van Dyke T. E. **Involvement of** protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNFalpha and IL-1 beta production by human monocytes. Journal of Immunology. v.153, n.4, 1994, p.1818-1824.

Shapira L, Sylvia VL, Halabi A, Soskolne WA, Van Dyke TE, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. **Bacterial Lipopolysaccharide Induces Early and Late Activation of Protein Kinase C in Inflammatory Macrophages by Selective Activation o PKC-ε.** Biochemical and Biophysical Research Communications. v.240, 1997, p.629-637.

Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. **Adhesive signaling in platelets.** Current Opinion in Cell Biology. v.6, n.5, 1994, p.695-704.

Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. **Integrin Signaling: The Platelet Paradigm.** Blood. v.91, n.8, 1998, p.2645-2657.

Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. Blood. v. 104, n. 6, set 2004, p.1606-1615.

Sheu JR, Hung WC, Kan YC, Lee YM, Yen MH. **Mechanisms involved in the antiplatelet activity of Escherichia coli lipopolysaccharide in human platelets.** British Journal ofHaematology. v.103, n.1, 1998, p.29-38.

Sheu JR, Hung WC, Su CH, Lin CH, Lee LW, Lee YM, Yen MH. The antiplatelet activity of Escherichia coli lipopolysaccharide is mediated through a nitric oxide/cyclic GMP pathway. European Journal of Haematology. v.62, n.5, 1999, p.317-326.

Signorello MG, Giacobbe E, Segantin A, Avigliano L, Sinigaglia F, Maccarrone M, Leoncini G. Activation of human platelets by 2-arachidonoylglycerol: role of PKC in NO/cGMP pathway modulation. Current Neurovascular Research.n.8, v.3, 2011, p.200-209.

Signorello MG, Giacobbe E, Passalacqua M, Leoncini G. **The anandamide effect on NO/cGMP pathway in human platelets.** Journal of Cellular Biochemistry. v.11, n.3, 2011, p.924-932.

Smolenski A, Burkhardt AM, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryam S, Lohamann SM, Walter U. Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. v.358, n.1, 1998, p.134-139.

Smolenski A. **Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets.** Journal of Thrombosis and Haemostasis. v.10, n.2, 2012, p.167-176.

Somers MJ, Burchfield JS, Harrison DG. Evidence for a NADH/NADPH oxidase in human umbilical vein endothelial cells using electron spin resonance. Antioxidant Redox Signaling. v.2, n.4, 2000, p.779-787.

Stabel S, Parker PJ. **Protein Kinase C.** Pharmacology & Therapeutics. v. 51, n.1, 1991, p.71-95.

Suzuki Y, Lehrer RI. **NAD(P)H oxidase activity in human neutrophils stimulated by phorbolmyristate acetate.** Journal of Clinical Investigation. v.66, n.6, 1980, p.1409-1418.

Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, Mori T, Nishizuka Y.**Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipiddependent protein kinase system.** Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 91, n. 4, 1979, p.571-577.

Tao Y, Gu YJ, Cao ZH, Bian XJ, Lan T, Sang JR, Jiang L, Wang Y, Qian H, Chen YC. Endogenous cGMP-dependent protein kinase reverses EGF-induced MAPK/ERK signal transduction through phosphorylation of VASP at Ser239. Oncology Letters. n.4, v.5, 2012, p.1104-1108.

Unsworth AJ, Smith H, Gissen P, Watson SP, Pears CJ.**Submaximal inhibition of** protein kinase C restores ADP-induced dense granule secretion in platelets in the presence of Ca²⁺. Journal of Biological Chemistry. v.286, n.24, 2011, p.21073-21082.

Unsworth AJ, Finney BA, Navarro-Nunez L, Severin S, Watson SP, Pears CJ.**Protein kinase Cε and protein kinase Cθ double-deficient mice have a bleeding diathesis.**Journal of Thombosis and Haemostasis. v.10, n.9, 2012, p.1887-1894.

Vanhaesebroeck B, Alessi DR. **The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB.** Biochemical Journal. v.346, 2000, p.561–576.

Vanni DS, Horstmann B, Benjo MA, Daher JPL, Kanaan S, Sleiman M. Nitric oxide: inhibition of platelets and participation in thrombus formationJornalBrasileiroPatologia e Medicina Laboratorial. v.43 n.3, 2007, p.181-189.

Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. **Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis.** International Immunopharmacology. v.4, n.3, 2004, p.327-347.

Vincent EE, Elder DJ, Thomas EC, Phillips L, Morgan C, Pawade J, Sohail M, May MT, Hetzel MR, Tavare JM. Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer. British Journal of Cancer. v.104, n.11, 20111, p.1755-1761.

Wachowicz B, Saluk J, Kaca W. **Response of blood platelets to Proteus mirabilis lipopolysaccharide.** Microbiology Immunology. v.42, n.1, 1998, p.47-49.

Wang F, Naik UP, Ehrlich YH, Osada S, Ohno S, Kornecki E. **Stimulatory antibodyinduced activation and selective translocation of protein kinase C isoenzymes in human platelets**. Biochemical Journal. 1995, p.401-406.

Watson SP1, Hambleton S. Phosphorylation-dependent and -independent pathways of platelet aggregation. Biochemical Journal. v.258, n.2, 1989, p.479-485.

Wen J, Ribeiro R, Zhang Y. Specific PKC isoforms regulate LPS-stimulated iNOS induction in murine microglial cells. Journal of Neuroinflammation. v.38, n.8, 2011.

Woulfe DS. Akt signaling in platelets and thrombosis. Expert Review of Hematology. v.3, n.1, 2010, p.81-91.

Yacoub D, Theoret JF, Villeneuve L, Abou-Saleh H, Mourad W, Allen BG. **Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha Ilb beta 3 activation, and thromboxane A2 release.** Journal of Biological Chemical. v.281, n.40, 2006, p.30024-30035.

Yaguchi A, Lobo FLM, Vincent JL, Praider O. **Platelet function in sepsis.** Journal of Thrombosis and Haemostasis, v.2, n.12, 2004, p.2096–2102.

Young JM, Panah S, Satchawatcharaphong C, Cheung PS. Human whole blood assays for inhibition of prostaglandin G/H synthases-1 and -2 using A23187 and lipopolysaccharide stimulation of thromboxane B2 production. Inflammation Research. v.45, n.5, 1996, p.243-253.

Yoon E, Babar A, Choudhary M, Kutner M, **Pyrsopoulos N. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update.** Journal of Clinical and Experimental Hepatology. v.4, n.2, 2016, p.131-142.

Zaid, Y, Senhaji N, Naya A, Fadainia C, Kojok K. **PKCs in thrombus formation.** PathologieBiologie. v.63, n.6, 2015, p. 268–271.

Zhang D, Anantharam V, Kanthasamy A, Kanthasamy A. G. **Neuroprotective Effect** of Protein Kinase C Inhibitor Rottlerin in Cell Culture and Animal Models of Parkinson's Disease. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics v.322, n.3, 2007, p.913-922.

Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, Du X, Li Z. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. Journal of Immunology. v.182, n.12, 2009, p.7997-8004.

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. **Vascular nitric oxide: Beyond eNOS.** Journal of Pharmacological Sciences. v.129, 2015, p.83-94.

Zheng Z, Yu S, Zhang W, Peng Y, Pu M, Kang T, Zeng J, Yu Y, Li G. Genistein attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats by activating PI3K/Akt/eNOSsignaling. Histology Histopathology. v.18, 2016.