



MARIA ELISA LOPES PIRES

Estudo das vias de sinalização envolvidas na ativação da NADPH oxidase e
na inibição da agregação plaquetária na sepse experimental

Campinas

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

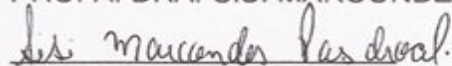
Maria Elisa Lopes Pires

**Estudo das vias de sinalização envolvidas na ativação da
NADPH oxidase e na inibição da agregação plaquetária na
sepse experimental**

ORIENTAÇÃO: Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de
título de Doutora em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
MARIA ELISA LOPES PIRES E ORIENTADA PELO
PROFA. DRA. SISI MARCONDES PASCHOAL


Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2013

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

L881e Lopes-Pires, Maria Elisa, 1980-
Estudo das vias de sinalização envolvidas na ativação da NADPH oxidase e na inibição da agregação plaquetária na sepse experimental / Maria Elisa Lopes Pires. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Sisi Marcondes Paschoal.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Plaquetas. 2. Agregação plaquetária. 3. NADPH oxidase. 4. Sepsis. I. Marcondes, Sisi, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of signaling pathways involved in the activation of NADPH oxidase and inhibition of platelets aggregation in experimental sepsis

Palavras-chave em inglês:

Platelets

Platelet aggregation

NADPH oxidase

Sepsis

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

Sisi Marcondes Paschoal [Orientador]

Carla Fernanda Franco Penateado

Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Paulina Sonnomiya

Ana Maria Moura da Silva

Data de defesa: 31-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARIA ELISA LOPES PIRES

ORIENTADORA: PROF. DR. SISI MARCONDES PASCHOAL

MEMBROS:

1. PROF. DR. SISI MARCONDES PASCHOAL Sisi Marcondes Paschoal
2. PROF. DR. CARLA FERNANDA FRANCO PENTEADO elppenteado
3. PROF. DR. SILVANA AUXILIADORA BORDIN DA SILVA snf
4. PROF. DR. PAULINA SANNOMIYA Paulina Sannomiya
5. PROF. DR. ANA MARIA MOURA DA SILVA Ana Maria

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

Data: 31 de julho de 2013

Dedicatória

Aos meus pais, Sr. José Pires e Sra. Inês Vieira, que serão eternamente meu espelho de dedicação e inteligência, para quem devo todas as conquistas de minha vida... Ao amor, conforto e compreensão infinitos que sempre me proporcionaram.

Aos meus irmãos, Sílvia Helena e Luís Henrique, minhas companhias eternas das quais me sinto completa... Pelo carinho, alegria e pelas palavras verdadeiras que me fazem seguir em frente.

Aos meus amigos que acreditam no meu potencial e fortalecem-me dia após dia.

À dança, que faz de mim uma pessoa alegre, realizada e motivada... Que finaliza meus dias dando-me força e energia para iniciar novas jornadas.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Sisi Marcondes, minha orientadora, pelos ensinamentos técnico-científicos, pela compreensão, amizade e sabedoria;

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pelo apoio, pelo laboratório, amizade e por fazer-me acreditar na ciência;

À FAPESP pelo apoio financeiro;

Ao grupo de pesquisa da Universidade Jean Monet- Saint Etienne- França, principalmente ao Prof. Dr. Fabrice Cognasse, que acolheu-me com carinho e pelos ensinamentos e paciência;

Ao Dr. Matheus Marin, pelo exemplo de inteligência e por socorrer-me nos momentos de desespero;

Aos Profs. Dr. Stephen Hyslop e Dr. Gabriel Anhê, pelos laboratórios e ensinamentos;

Às minhas colegas de laboratório Ana Carolina, Débora, Nádia e Gisele, que me ajudaram nos experimentos e com os quais eu desenvolvi uma grande amizade;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Unicamp, Sr. Miguel e José Ilton pela atenção, ajuda e paciência;

Aos colegas da “Bioquímica”, “Célula”, “Cascata”, “Edema” e “Labffamel” pelos ensinamentos e amizade;

À Karin, técnica do CPQBA, pela doação de animais.

“Temos a arte para não morrer da verdade”

Friedrich Nietzsche

Sumário

LISTA DE MATERIAIS

.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1-INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Plaquetas.....	17
1.2 Septicemia e Lipopolissacarídeo.....	20
1.3 Liberação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio por plaquetas na Sepse.....	22
2-OBJETIVO.....	28
2.1-Objetivos específicos.....	28
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1-Animais.....	29
3.2-Tratamento com LPS	29
3.3 Obtenção de plaquetas lavadas.....	29
3.4-Agregação plaquetária.....	30
3.5-Determinação de EROs por citometria de fluxo.....	30
3.6-Western blotting.....	31
3.7-Determinação de TNF- α	31
3.8-Determinação de GMPC intraplaquetário.....	31
3.9-Análise estatística.....	32
4-RESULTADOS.....	33
4.1 Efeito do LPS na concentração plasmática de TNF- α em ratos.....	33
4.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA MODULAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DE RATOS TRATADOS COM LPS	34
4.2.1 Efeito da inibição da Src na agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS	34

4.2.2 Efeito da inibição da PI3K e da Akt na agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS	37
4.2.3 Determinação da presença de proteínas contendo resíduos de 3-nitrotirosina em plaquetas de ratos tratados com LPS	40
4.2.4 Efeito da inibição da PKC na agregação plaquetária e na formação de GMPc em plaquetas de ratos tratados com LPS	42
4.2.5 Efeito da inibição da guanilil ciclase solúvel e da PKG na agregação plaquetária de ratos injetados com LPS	45
4.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) EM PLAQUETÁRIA DE RATOS TRATADOS COM LPS	46
4.3.1 Efeito da inibição da PKC na geração de EROs e na fosforilação do resíduo Ser 345 da p-47 phox em plaquetas de ratos tratados com LPS	46
4.3.2 Efeito da inibição da Src na geração de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS	49
4.3.3 Efeito da PI3K e da Akt na geração de EROS em plaquetas de ratos tratados com LPS	50
4.3.4 Efeito da inibição da guanilil ciclase solúvel e da PKG na geração de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS	51
4-DISCUSSÃO	52
4.1 Vias de sinalização envolvidas na modulação da agregação plaquetária de ratos tratados com LPS	52
4.2 Vias de sinalização envolvidas na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plaquetas de ratos tratados com LPS	56

5- CONCLUSÕES.....	59
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

Lista materiais

Substância	Procedência
ADP	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Anti-cSrc quinase	Merck Millipore
Anti-fosfo (Tyr 416)-c-Src	Merck Millipore
Anti-nitrotirosina; anti-Akt	Merck Millipore
Anti-fosfo (Thr308)-Akt	Merck Millipore
Anti- fosfo Ser 345	Merck Millipore
Anti- p47-phox	Merck Millipore
API-1	Tocris Bioscience House (Bristol, UK)
DCFH-DA	Sigma- Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
DPI	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Galato de (-) Epigallocatequina	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
GF 109203X	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
LPS	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
ODQ	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)

PP2	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Rp-8-Br	Tocris Bioscience House (Bristol, UK)
Wortmanin	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)

Lista de abreviaturas

ADP	Adenosina di-fosfato
Akt	Treonina proteína quinase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
COX-1	Cicloxygenase-1
COX-2	Cicloxygenase-2
DCFH-DA	2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
DPI	Difeniliodônio
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
GCs	Guanilil cilase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
LBP	Proteína ligante de LPS
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitógeno
NADPH oxidase	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo (fosfato) oxidase

NF-κB	Fator nuclear κB
NO	Óxido Nítrico
c-NOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
e-NOS	Óxido nítrico sintase endotelial
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzível
n-NOS	Óxido nítrico sintase neuronal
O₂⁻	Ânion superóxido
OH⁻	Radical hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
PAF	Fator de ativação plaquetária
PI3K	Fosfatidilinositol 3- quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PLC	Fosfolipase C
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido desmutase

TLR4	Toll-like receptor 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TXA₂	Tromboxano A ₂
vWf	Fator de von Willebrand
XD	Xantina desidrogenase
XO	Xantina oxidase
XOR	Xantina óxido redutase

Lista de figuras

Figura 1: Efeito do LPS na concentração plasmática de TNF- α em ratos

Figura 2: Efeito da inibição da Src na agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS

Figura 3: Detecção das enzimas c-Src e P-(Tyr 416)-Src em plaquetas de ratos tratados com salina ou com LPS

Figura 4: Efeito da inibição da PI3K e da Akt na agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS

Figura 5: Detecção das enzima Akt e P-(Thr308)-Akt em plaquetas de ratos tratados com salina ou com LPS

Figura 6: Detecção de proteínas contendo resíduos de nitrotirosina em plaquetas de ratos tratados com LPS

Figura 7: Efeito do sequestrador de peroxinitrito na agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS

Figura 8: Efeito da inibição da PKC na agregação plaquetária de ratos injetados com LPS

Figura 9: Efeito da inibição da PKC nos níveis de GMPc em plaquetas de ratos tratados com LPS

Figura 10: Efeito do inibidor da guanilil ciclase solúvel e da PKG na agregação plaquetária de ratos injetados com LPS

Figura 11: Efeito do inibidor da PKC na geração de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS

Figura 12: Efeito da inibição da PKC na fosforilação do resíduo Ser 345 da p-47phox de plaquetas de ratos tratados com LPS

Figura 13: Efeito do inibidor da Src na geração de EROS em plaquetas de ratos tratados com LPS

Figura 14: Efeito dos inibidores da PI3K e da Akt na geração de EROS em plaquetas de ratos tratados com LPS

Figura 15: Efeito do inibidor da guanilil ciclase solúvel e da PKG na geração de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS

Resumo

A sepse é ainda causa de muitos óbitos em hospitais do mundo todo. A gravidade da sepse está relacionada ao estado de ativação de plaquetas. Trabalho prévio do nosso grupo mostrou que o tratamento de ratos com lipopolissacarídeo (LPS) leva a inibição da agregação plaquetária e aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) via NADPH oxidase. Entretanto, o efeito inibitório do LPS na agregação não é dependente da liberação de EROs. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar as vias de sinalização envolvidas na inibição da agregação e na ativação da NADPH oxidase em plaquetas de ratos tratados com LPS. Para tanto, ratos Wistar machos foram injetados com LPS (1 mg/kg, i.p.) e após 6h ou 48h o sangue foi coletado. A agregação plaquetária foi induzida por ADP (10 μ M) na ausência e na presença de diferentes inibidores enzimáticos. A formação de EROs em plaquetas foi determinada por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA e a concentração intraplaquetária de GMPc por imunoenensaio. Também foram realizados ensaios de western blotting para a análise da ativação das enzimas c-Src, AKT e NADPH oxidase, bem como para a detecção de proteínas contendo resíduos de nitrotirosina. A análise do western blotting mostrou que a fosforilação da c-Src quinase no resíduo Tyr 416, que indica ativação da enzima, foi semelhante em plaquetas de ratos injetados com salina ou LPS em 6h ou 48h. Além disso, a inibição de Src com PP2 (10 μ M) não modificou a agregação plaquetária de ratos tratados com LPS. Nós verificamos que a inibição da agregação foi acompanhada por um aumento significativo dos níveis de GMPc, bem como da nitratação de proteínas, em plaquetas de ratos 6h ou 48h após o tratamento com LPS. A incubação das plaquetas com o sequestrador de peroxinitrito -(-) epigallocatequina gallato (10 μ M) aumentou significativamente a agregação de ratos injetados com LPS em 48h, mas não alterou a agregação em 6h. Entretanto, a inibição da agregação plaquetária em ratos tratados com LPS em 6h foi revertida pelo inibidor da enzima guanilil ciclase ODQ (25 μ M) ou pelo inibidor de PKG Rp-8-Br (25 μ M). De forma semelhante, o inibidor não seletivo de PKC GF109203X (10 μ M) reverteu o efeito inibitório do LPS em 6h na agregação e reduziu os níveis de GMPc em plaquetas. Nós mostramos que a fosforilação da AKT no resíduo Thr308 foi significativamente maior em plaquetas de ratos tratados com LPS quando comparado com ratos injetados com salina. A incubação das plaquetas de ratos tratados com LPS com o inibidor de PI3K wortmannin (100 nM) não modificou a agregação. Entretanto, o inibidor da AKT PPI-1 (20 μ M)

aumentou a agregação para níveis semelhantes aos observados nos ratos injetados com salina. A agregação plaquetária de ratos 48h após o tratamento com LPS não foi afetada por nenhum dos inibidores enzimáticos utilizados neste trabalho. O aumento da geração de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS em 6h ou 48h foi acompanhado pelo aumento significativo da fosforilação do resíduo Ser345 na subunidade p47-phox da NADPH oxidase. A incubação de plaquetas de ratos tratados com LPS com GF109203X inibiu a fosforilação da p47-phox bem como reduziu a geração de EROS. A produção aumentada de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS em 6h também foi reduzida em 42% por PP2. A inibição de PI3K ou AKT não modificou a produção de EROS em plaquetas de ratos tratados com LPS. A incubação de plaquetas com ODQ ou com Rp-8-Br (5 μ M) reduziu significativamente a produção de EROS somente em plaquetas de ratos 48h após o tratamento com LPS. Portanto, no presente trabalho podemos concluir que a inibição da agregação plaquetária observada 6h após a injeção de LPS é mediada pela via NO/GMPc/PKG e também é modulada pela PKC e AKT, enquanto que, o efeito inibitório do LPS em 48h é essencialmente dependente da formação de peroxinitrito. A produção aumentada de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS envolve a fosforilação da subunidade p47-phox da NADPH oxidase pela PKC. Além da PKC, são importantes no aumento da liberação de EROs em plaquetas a Src em 6h e a via GMPc/PKG em 48h após a injeção de LPS.

Abstract

Sepsis is still a cause of high mortality in hospitals all over the world and its severity is directly related to platelet activity. A previous work of our group showed that the treatment of rats with lipopolysaccharide (LPS) inhibited platelet aggregation and also increased reactive oxygen species (ROS) production which was mediated especially by NADPH oxidase. However, the inhibitory effect of LPS on platelet aggregation is independent of ROS formation. Therefore, in the present work we investigated the signaling pathways involved in the aggregation inhibition as well as in the increased ROS formation in platelets of LPS-treated rats. Male Wistar rats were injected with LPS (1 mg/kg, i.p.) and blood was collected after 6h or 48h. Platelet aggregation was induced by ADP (10 μ M) in the absence or in the presence of different enzymatic inhibitors. ROS formation in platelets was determined through flow cytometry using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and cGMP intraplatelet levels by enzyme immunoassay kit. Western blotting assays were carried out to analyze AKT and NADPH oxidase activation and the presence of nitrated proteins in platelets. In the present work, we observed that the inhibition of aggregation was accompanied by a significant increase of cGMP levels as well as protein nitration in platelets of LPS-treated rats. Incubation of platelets with the peroxynitrite scavenger (-) epigallocatechingallate (10 μ M) significantly increased aggregation of LPS-treated rats at 48h, but did not modify it at 6h. However, the inhibitory effect of LPS at 6h on platelet aggregation was reversed by the guanylyl cyclase (sGC) inhibitor ODQ (25 μ M) or by the PKG inhibitor Rp-8-Br (25 μ M). Likewise, the PKC inhibitor GF109203X (10 μ M) reversed the inhibition of aggregation and the increased cGMP levels in platelets of LPS-treated rats at 6h. We demonstrated that AKT phosphorylation at Thr308 was significantly higher in platelets of LPS-injected rats than in the saline group. The AKT inhibitor PPI-1 (20 μ M) increased platelet aggregation of rats 6h after LPS-injection to the levels comparable to the saline group, despite of the PI3K inhibitor wortmannin (100 nM) has had no effect. Platelet aggregation of rats 48h after LPS injection was not affected by any enzymatic inhibitors used in this work. Increased ROS formation in platelets of LPS injected rats at 6h or 48h was followed by a marked increase of the NADPH oxidase subunit p47-phox phosphorylation at Ser345. Incubation of platelets of LPS-injected rats with GF109203X inhibited the p47-phox phosphorylation as well as ROS generation. The increased ROS production in platelets of rats 6h after LPS-injection was reduced 42% by PP2. Inhibition of both

PI3K and AKT did not change ROS production in platelets of LPS-injected rats. Incubation of either ODQ or Rp-8-Br (5 μ M) reduced significantly the ROS production just in platelets of rats 48h after LPS-injection. Therefore, our results show that the inhibition of ADP-induced platelet aggregation of rats 6h after LPS injection is mediated by NO/cGMP/PKG-dependent mechanisms, and PKC and AKT probably act upstream upregulating this pathway. On the other hand, the inhibitory effect of LPS at 48h on platelet aggregation is essentially dependent on ONOO⁻ production. In addition, our results show that the augmented ROS production in platelets of LPS-treated rats is mediated by PKC-dependent phosphorylation of p47-phox. Besides PKC, the increased ROS formation in platelets is also modulated by Src at 6h after LPS injection, while NO/cGMP/PKG pathway takes part of this effect at 48h.

1. Introdução

1.1 Plaquetas

As plaquetas são fragmentos anucleados de megacariócitos da medula óssea e apresentam tempo de vida de aproximadamente 10 dias. Apesar de anucleadas, as plaquetas são células bastante organizadas e ricas em diferentes organelas, como mitocôndrias viáveis, sistema tubular denso e três tipos de grânulos morfologicamente diferentes que estocam diferentes tipos de constituintes: os grânulos alfa, os grânulos densos e os lisossomas (Rendu e Brohard-Bohn, 2001)

Os grânulos densos estocam íons bivalentes e moléculas pequenas não protéicas, como o difosfato de adenosina (ADP), o trifosfato de adenosina (ATP), serotonina e pirofosfato, que são secretadas para recrutar outras plaquetas e exercem funções centrais na amplificação da ativação e agregação plaquetária, assim como na modulação do endotélio vascular e da função leucocitária. Os grânulos alfa contêm moléculas de adesão importantes para as interações da plaqueta e outras plaquetas, células sangüíneas e tecidos e substâncias inflamatórias. Contêm ainda fatores mitogênicos, proteínas plasmáticas e fatores relevantes para a coagulação e fibrinólise. Os grânulos lisossômicos contêm glicosidases, proteases e proteínas catiônicas com atividade bactericida. As enzimas hidrolíticas liberadas digerem material dos agregados plaquetários circulantes. As plaquetas apresentam um complexo citoesqueleto, consistindo de microtúbulos que exerce importante papel na ativação plaquetária, secreção granular e na retração do coágulo. Na circulação, as plaquetas são reativas a vários estímulos e liberam o material contido em seus grânulos. Essa reação de secreção é um passo importante na hemostase primária. A energia o Ca^{+2} necessária para a reatividade plaquetária é fornecida pela mitocôndria e pelo sistema tubular denso (Rendu e Brohard-Bohn, 2001).

De forma geral, o início da ativação plaquetária se dá pela ligação do agonista ao receptor específico. A maior parte dos receptores estão acoplados às proteínas G (GPCRs) que têm a função de amplificar o sinal inicial dado pelos ligantes. Plaquetas humanas expressam dez membros das famílias Gs, Gi, Gq e G_{12} . Um membro da família Gs, quatro da família Gi (G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} e G_z), três da família Gq (G_q , G_{11} e G_{16}) e dois membros da família G_{12} (G_{12} e G_{13}). A partir da Gq, ocorre a sinalização inicial pela ativação da fosfolipase C (PLC), sendo que a ativação depende de agonistas. A PLC hidrolisa fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) presente na membrana gerando os segundos mensageiros, trifosfato-1,4,5-inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O DAG é responsável por ativar a

PKC, enquanto o IP_3 leva a liberação de Ca^{+2} do sistema tubular denso. O Ca^{+2} ativa a quinase da miosina de cadeia leve (MLCK) que através da fosforilação da miosina promove a intersecção actina/miosina que leva a mudança de forma plaquetária. (Klages et al. 1999; Offermanns 2001; Shattil et al., 2010).

As proteínas Gs e Gi levam a ativação e a inibição, respectivamente, da enzima adenil ciclase responsável pela metabolização do ATP em AMPc. O AMPc é um importante segundo mensageiro, que em plaquetas inibe a liberação de Ca^{+2} do sistema tubular denso levando a inibição da ativação plaquetária (Murata et al. 1997; Yang et al. 2002).

Os eventos intracelulares que ocorrem após a interação do agonista ao seu receptor caracterizam a sinalização inside-out, a qual é finalizada com a ativação do receptor de fibrinogênio, a integrina $\alpha IIb\beta 3$. Após a ligação do fibrinogênio ao seu receptor, inicia-se a segunda fase de ativação plaquetária denominada sinalização outside-in, importante para a estabilização do agregado plaquetário (Prevost et al. 2007; Shattil 2009; Stegner and Nieswandt 2011; Wu et al., 2000). Um dos primeiros eventos que ocorre após a ativação da integrina $IIb\beta 3$ é a ativação da enzima c-Src. A c-Src é uma tirosina quinase pertencente a Src. Em plaquetas já foram descritas a presença de cinco enzimas da família Src: a c-Src, Fyn, Lyn, Lck e Yes (Wong, et al., 1992, Liebenhoff, et al., 1993, 1994, Clark and Brugge, 1993, Ichinohe et al., 1995; Boylan et al. 2008; Law et al. 1999a, b). A fosforilação do resíduo de tirosina 530 da c-Src humana (em camundongos o resíduo 527) tem efeito regulatório, inibindo sua própria atividade enzimática (Cooper et al., 1986, Cooper and King, 1996). A maior parte das moléculas de c-Src quinase em plaquetas em repouso, ou plaquetas não ativadas, está fosforilada na tirosina 530, cuja fosforilação é atribuída à ação da enzima Csk (Okada and Nakagawa, 1989, Okada et al., 1991, Nada et al., 1991). Quando as plaquetas são estimuladas, a c-Src tem seu resíduo 530 desfosforilado por fosfatases, levando a ativação da enzima (Falet et al., 1996, Somani et al., 1997). A desfosforilação da tirosina 530 permite que a c-Src se autofosforile no resíduo de tirosina 418, causando um aumento da atividade desta enzima (Falet et al., 1996, Somani et al., 1997).

As plaquetas são ativadas por diferentes agonistas como colágeno, trombina, TXA_2 e pelo ADP. Estudos de agregação *ex vivo* mostraram que todos os agonistas plaquetários são dependentes da liberação de ADP, promovendo a agregação máxima. As plaquetas de humanos e de ratos expressam dois GPCRs para ADP: Gq acoplado ao receptor $P2Y_1$ e Gi acoplado ao receptor $P2Y_{12}$. Uma ótima ativação das plaquetas pelo ADP requer ativação de ambos receptores. Quando o $P2Y_1$ é bloqueado ou deletado, o ADP ainda é capaz de inibir a formação do AMPc, mas a liberação de Ca^{+2} ,

mudança de forma e agregação são muito prejudicadas (Offermanns et al. 1997). Já está bem estabelecido que a proteína Gi está associada a inibição da formação de AMPc, entretanto ela também leva a ativação da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K), de membros da família Src e Rap1b (Dorsam et al. 2002; Lova et al. 2002; Woulfe et al. 2002,2004).

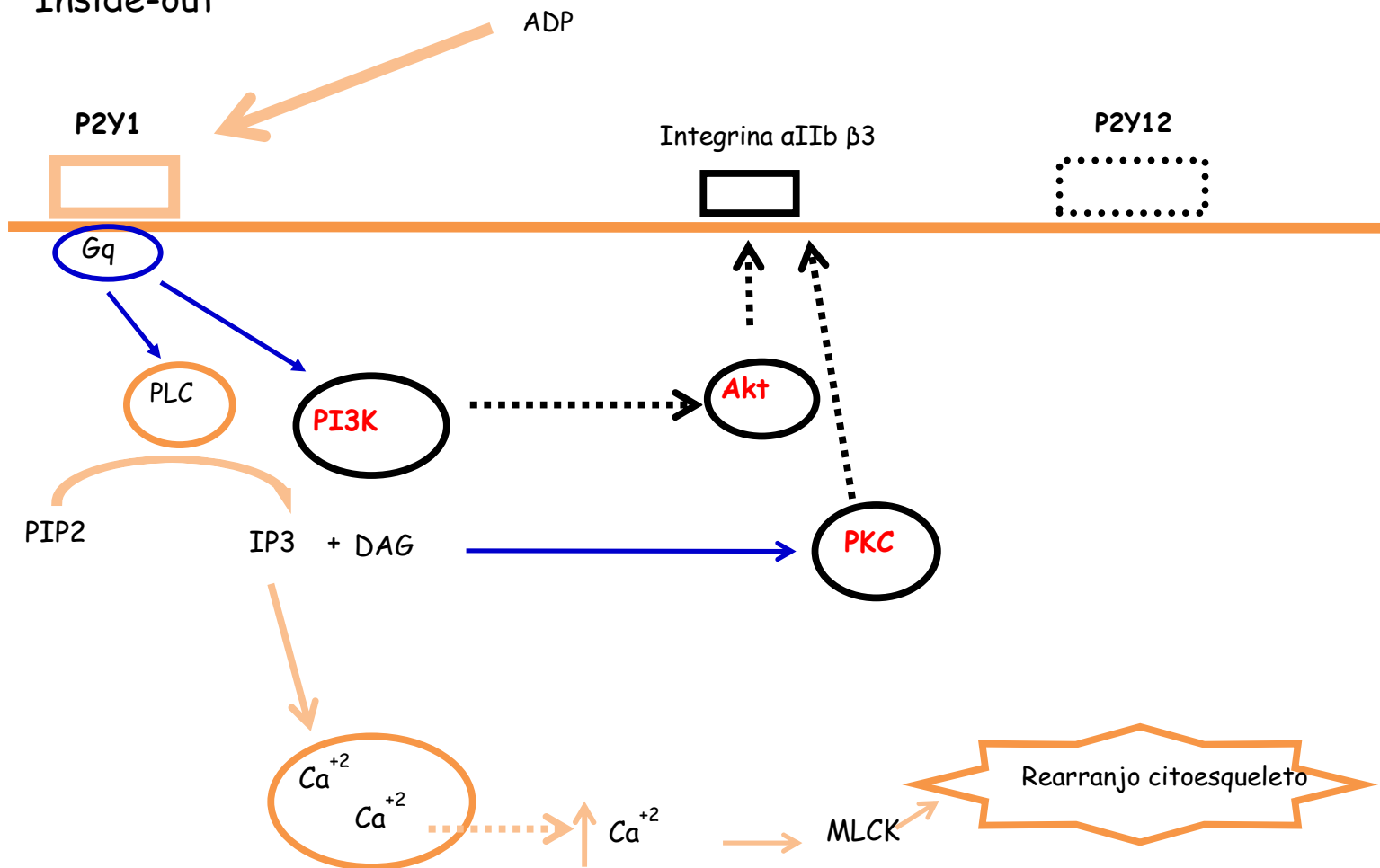
A PI3K fosforila PI-4-P e PI-4,5-P₂ produzindo PI-3,4-P₂ e PI-3,4,5-P₃. Em plaquetas humanas, há a expressão das isoformas α , β , γ e δ da PI3K e cada uma apresenta uma subunidade catalítica e uma subunidade regulatória. Estudos mostram que a PI3K está envolvida na sinalização por parte da Gi assim como da Gq e envolve a ativação da serina/treonina quinase, Akt (Woulfe et al. 2004) e Rap-1b (Jackson et al. 2005). A deleção da PI3K α reduz a agregação (Hirsch et al. 2001) enquanto que a da PI3K β compromete a ativação da Rap1b e a formação do trombo *in vivo* (Jackson et al. 2005).

Há três diferentes isoformas de Akt identificadas em humanos que apresentam mais que 80% de homologia e são nomeadas Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β), and Akt3 (PKB γ) (Jones et al, 1991). A translocação da Akt da membrana celular e a fosforilação da Thr 308 e da Ser 473 são requeridas para sua a atividade (Barragán et al, 2006). A Akt é ativada por vários agonistas incluindo fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento epidermal, insulina, fator de crescimento do nervo (NGF), U46619 (análogo do tromboxano), convulxina e trombina (Kroner et al, 2000; Berry et al, 2002; Cho et al, 2022). A inibição da PI3K inibe a ativação da Akt (Burgering and Coffe, 1995) indicando que a PI3K é um regulador da Akt. A Akt, além de ser ativada pela PI3K, pode ainda ser ativada pela PKC, via fosforilação da Ser473 e Thr308(Kroner et al, 2000; Barragán et al, 2006). A maior parte da Akt expressa em plaquetas é a isoforma Akt2, mas a Akt1 e Akt3 também estão presentes (O'Brien et al. 2011). Todas as três contribuem para a ativação plaquetária. A deleção do gene para Akt1, ou Akt2 ou Akt3 inibe a secreção, agregação e estabilização do trombo (Chen et al. 2004; O'Brien et al. 2011; Woulfe et al. 2004; Chen et al. 2005).

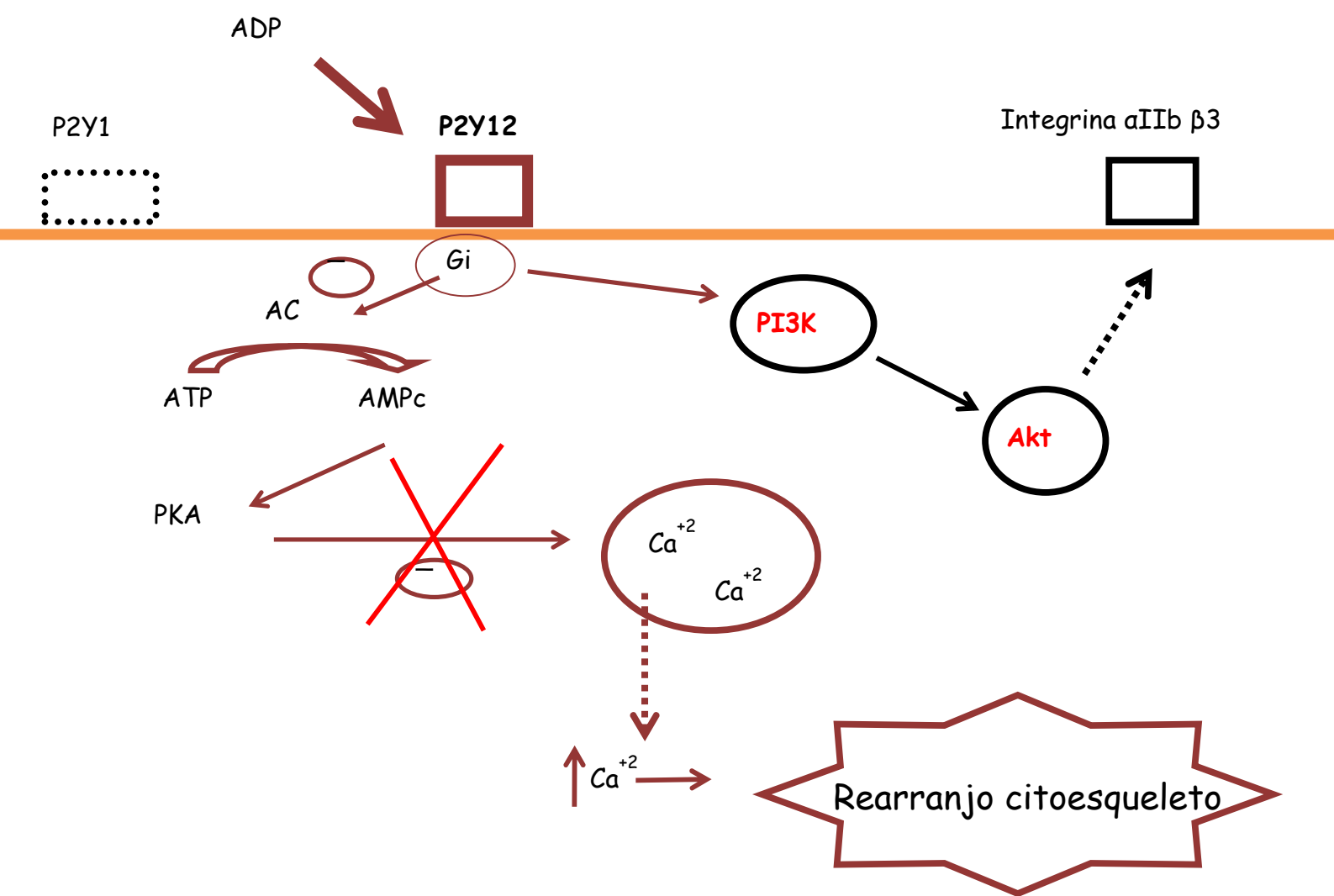
Outra importante enzima envolvida na modulação da atividade plaquetária é a PKC. A PKC é uma das três principais serina-treonina quinases. Ela está envolvida em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento. A família PKC inclui 12 isoformas (α , β I, β II, δ , ϵ , γ , ι , η , μ , θ , ζ), classificadas em convencional e original (cPKC e nPKC, respectivamente). Ambas são cálcio-dependentes, ativadas pela fosfatidil-serina e pelo DAG. Além dessas há a PKC atípica (aPKC) que é cálcio-dependentes e ativada pela fosfatidil-serina mas não requerem o DAG para ativação. Essas isoformas são distribuídas em vários

tecidos, apresentando diferenças de acordo com sua localização (Newton et al, 1995). Estudos iniciais mostraram que a utilização de inibidores não seletivos para os membros da família PKC inibe ou abole a ativação plaquetária incluindo secreção de grânulos e agregação (Watson e Hambleton, 1989; Atkinson et al, 2001; Gresele et al, 2002). As enzimas da família PKC também modulam a entrada de Ca^{+2} (Rosado e Sage, 2000; Streh t al, 2007), a sinalização *outside-in* (Soriane et al, 2006; Buensuceso et al; 2005), a ativação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (Buensuceso et al; 2005) e adesão das plaquetas na matriz extracelular ou em células (Haimovich et al, 1996).

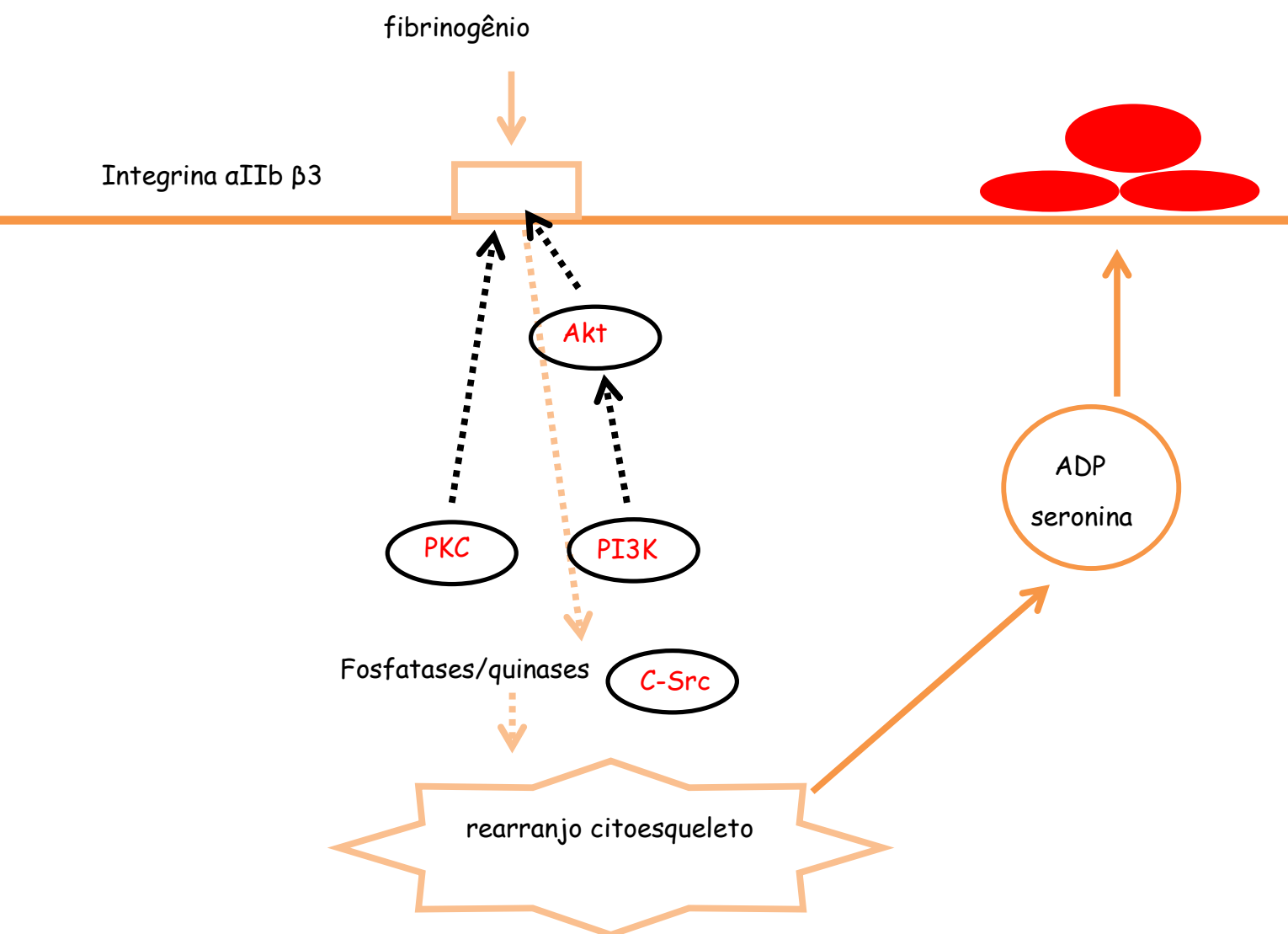
Inside-out



Inside-out



Outside-in



1.2 Septicemia e Lipopolissacarídeo

Um dos problemas mais freqüentes e mais sérios com que os clínicos se deparam é o controle das infecções que provocam uma resposta inflamatória sistêmica denominada septicemia (Araújo, 2005).

Estudos realizados em 75 UTIs do Brasil com uma amostra de 3.128 pacientes mostrou a sepse com uma incidência de 16,7% e mortalidade de 46,6%, ou seja, cerca da metade das pessoas morreram por este mal. Estes resultados são superiores aos relatados nas publicações europeias e norte-americanas que são considerados locais que possuem uma das melhores assistências curativas (Sales et al, 2006). Normalmente a sepse é causada por uma infecção bacteriana, mas também pode ser causada por outros microorganismos como vírus e fungos (Bochud e Calantra, 2003). De modo geral, a sepse caracteriza-se por uma diminuição da atividade cardiocirculatória resultante da liberação descontrolada de cininas, prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico (NO) e, além disso, ocorre também a redução simultânea do débito cardíaco. A diminuição da pressão arterial e da perfusão tecidual juntamente com a reação inflamatória acaba gerando danos funcionais nos sistemas renal, hepático e pulmonar, que podem culminar na disfunção múltipla de órgãos (Brandtzaeg, 1996).

As bactérias gram-negativas mais comuns presentes 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 lipopolissacáride (LPS) presente na parede desses organismos (Bochud e Calantra, 2003).

O LPS pode ativar muitos tipos de células, incluindo leucócitos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos, células endoteliais e plaquetas (Perera, 2001; Sabroe et al, 2002; Zeuke et al, 2002; Andonegui, 2005). O mecanismo molecular de ativação se dá pela ligação do LPS a molécula CD14 presente em macrófagos, monócitos, neutrófilos e plaquetas a qual pode ser facilitada pela proteína ligante de LPS (LBP) (Amura et al, 1998; Ibeagha-Awemu, 2008). Uma vez que a molécula CD14 não possui domínio transmembrana a sinalização intracelular se dá através do receptor TLR (toll-like receptor), uma glicoproteína transmembrana expressa em leucócitos, linfócitos, endotélio vascular e plaquetas (Andonegui et al, 2005; Jayachandran et al, 2007). Até agora, 11 membros da família TLR foram identificados em humanos e 13 em ratos (Imgemex, 2009). O TLR4 é responsável pelo reconhecimento da maioria das bactérias gram-negativas. O complexo CD14/TLR leva a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) através de uma cascata de fosforilações desencadeada por uma família de quinases denominada proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Jean-Baptiste, 2007). A ativação do NF- κ B está envolvida na ativação de inúmeros genes inflamatórios que codificam proteínas como citocinas, quimiocinas e enzimas (Heuman e Roger, 2002).

O evento que ocorre mais precocemente na fase inicial da endotoxemia é a diminuição significativa do número de leucócitos e plaquetas no sangue periférico. Em humanos, o número de plaquetas acumuladas em órgãos periféricos e o grau de ativação destas plaquetas, determinado através da expressão de proteínas presentes na membrana plaquetária como a CD62P e o receptor de fibrinogênio, a integrina α IIb β 3, apresentam correlação positiva com a gravidade da sepse e, por conseguinte, com o desenvolvimento da disfunção múltipla de órgãos (Russwurm et al, 2002; Gawaz et al, 1997).

Vários efeitos do LPS, apesar de bastante controversos, têm sido observados em plaquetas, no entanto, somente em 2005 foi descrito pela primeira vez a presença do receptor funcional de LPS – “toll-like receptor-4” – nestes elementos (Andonegui et al, 2005).

Experimentos *in vivo* de microscopia intravital mostraram que o LPS de *E. coli* aumenta a adesão de plaquetas a vênulas de intestino de camundongo (Cerwinka et al, 2002), entretanto este efeito parece ser mediado por neutrófilos através da liberação do ânion superóxido (Cerwinka et al, 2003). Outro grupo de pesquisadores também demonstrou que o LPS de *E. coli* é capaz de aumentar a adesão plaquetária em vênulas de mesentério de ratos através do efeito direto da endotoxina

aumentando a expressão da P-selectina do endotélio e da GPIIb da membrana plaquetária (Katayama et al, 2000). Zhang e colaboradores mostraram que o LPS de *E.coli* estimula a secreção dos grânulos densos e alfa de plaquetas humanas, bem como potencializa a agregação induzida por trombina e colágeno em baixas concentrações de forma dependente de GMPc e ativação de PKG (Zhang et al, 2009).

Por outro lado, a agregação de plaquetas humanas e de coelho induzida por colágeno é inibida, de forma dependente da concentração, por LPS de *Escherichia coli*, sendo este efeito acompanhado de aumento de GMPc, inibição da mobilização de Ca^{+2} intracelular e inibição da ativação da proteína C quinase (Sheu et al, 1998; Sheu et al, 1999). A incubação de plaquetas com endotoxinas de várias origens também inibe a agregação plaquetária induzida pelo ionóforo de Ca^{2+} , A23187, mas não apresenta nenhum efeito na aglutinação plaquetária induzida pela ristocetina (Saba et al, 1984). E ainda, pacientes com sepse apresentam diminuição da agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno, tromboxano e ácido araquidônico (Yaguchi et al, 2004). Nosso grupo verificou que o tratamento de ratos com LPS por 6h, 8h e 48h causa redução significativa da adesão de plaquetas ao fibrinogênio, bem como da agregação induzida por ADP (Casarin et al, 2011; Lopes-Pires et al, 2011).

Trabalhos mostram que a sinalização intracelular via Src quinase e PI3K medeiam alguns efeitos oriundos da ação de LPS em diferentes células (Smolinska et al., 2008, Lin et al., 2008, Kox et al, 2007, Gong et al., 2008), mas ainda pouco é discutido em plaquetas. Já foi demonstrado que o LPS aumenta a expressão de Src quinases em macrófagos e a inibição destas enzimas reduz a ativação do fator NF-KB e a produção de TNF α (Leu et al., 2006, Smolinska et al., 2008). Recentemente, Maa e colaboradores (2008) demonstraram que o aumento da expressão da Src quinase induzido por LPS foi mediado pela geração de NO. O LPS também aumenta a expressão da molécula de adesão VCAM-1 e a adesão de neutrófilos a células musculares lisas de traquéia humana via ativação de Src quinase e PI3K (Lin et al., 2008). Outro trabalho mostra que a hiporreatividade da artéria caudal de ratos à fenilefrina e concentrações elevadas de K^{+} causada por LPS é mediada pela Src quinase (Kox et al, 2007). Em 2008, Gong e colaboradores demonstraram que o LPS induz a fosforilação de proteínas de adesão intercelular, como a caderina e a gama-catenina, de células endoteliais de microvasculatura de pulmão humano via ativação de quinases de tirosina como a Src. Já a ativação da PI3K, é uma via importante na secreção de colágeno por fibroblastos de pulmão de camundongo induzida por LPS. A ativação desta via também está envolvida no aumento de O_2^{-} em plaquetas causado por LPS de *Proteus mirabilis* (Zielinski et al, 2001).

A Akt é outra importante enzima participante da sinalização do LPS em células. Em células cardíacas, a reperfusão e isquemia induzida pelo LPS envolve a via PI3K/Akt (Liu et al, 2010 abaixo). Em células adrenais, o nível de aldosterona no plasma estimulado pelo LPS se dá por sua ligação ao TLR-2 e TLR-4, via Akt (Huang et al, 2010 abaixo)

1.3 Liberação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio por plaquetas na Seps

O LPS, além de liberar mediadores inflamatórios clássicos induz a geração de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) por diferentes células (McCuskey et al, 1996).

Dentre as ERNs podemos citar o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito formado (ONOO⁻) pela reação entre o NO e o ânion superóxido (O₂⁻).

O NO é uma espécie reativa de nitrogênio formado a partir da arginina pela óxido nítrico sintase (NOS). Há 3 isoformas de NOS – endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS). Em plaquetas já foram descritas as isoformas eNOS e iNOS (Mehta et al., 1995; Chen & Mehta, 1996). A atividade da eNOS pode ser modulada por diferentes enzimas como a PKC e a Akt (Cathcart, 2004; Loegering, 2011). Trabalhos mostraram que a fosforilação da Thr497, promovida pela PKC está associada à inibição da eNOS (Dudzinski et al, 2007; Mount et al, 2007). Monti e colaboradores demonstraram que quando a isoforma δ PKC está inativa a ϵ PKC torna-se ativa, fosforilando os domínios Thr497 e Ser116, inativando a eNOS. Já a ativação da eNOS se dá pela fosforilação da Ser1179 através δ PKC ativa e da ϵ PKC inativa (Monti et al, 2009). Em células endoteliais a Akt ativa diretamente a eNOS (Michell et al, 1999 abaixo). Maontagnani e grupo verificaram que a insulina regula a atividade da eNOS utilizando mecanismo independente de Ca⁺² e requerindo fosforilação pela Akt (Montagnani et al, 2001).

O NO é um radical reativo abundante que age como um importante sinalizador molecular oxidativo em uma diversidade de processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa, relaxamento do músculo liso, inibição da atividade plaquetária e regulação imunológica (Bergenti et al, 1999; Marcondes et al, 2006). Seus efeitos biológicos são iniciados através da ativação da enzima heterodimérica guanilil ciclase solúvel (GCs) e /ou através de outras reações químicas que independem dessa enzima (Bian e Murad, 2003).

A GCs converte GTP em GMP cíclico (GMPC) (Ignarro e Kadowitz, 1985) levando a ativação da proteína quinase dependente de GMPC (PKG) (Gkaliagkousi et al, 2007). A PKG inibe a

ativação plaquetária através da estimulação da bomba de Ca^{+2} ATPase do sistema tubular denso aumentando a recaptação de Ca^{+2} e portanto diminui sua concentração no citosol (Trepakova et al, 1999). Além disso, a PKG inibe a produção de IP_3 e a fosforilação do receptor IP_3 o qual reduz a liberação de Ca^{+2} do sistema tubular denso (Schlossmann et al, 2000). Outros dois mecanismos estão envolvidos na modulação da atividade plaquetária via GMPc mas independente de PKG Primeiro o GMPc indiretamente aumenta os níveis intracelulares de AMPc através da inibição da fosfodiesterase tipo 3 (Radomski et al, 1987; Maurice e Haslam, 1990; Bowen e Haslam, 1991). Segundo, o GMPc inibe a ativação da PI3K que está envolvida na ativação do receptor de fibrinogênio (Pigazzi et al, 1999).

O efeito de peroxinitrito em plaquetas ainda é pouco compreendido uma vez que este radical pode tanto ativar como inibir a agregação. Em plaquetas lavadas, concentrações elevadas do peroxinitrito induzem agregação acompanhada pela expressão de p-selectina e desgranulação (Moro et al., 1994; Brown et al., 1998). Por outro lado, em plasma rico em plaquetas (PRP), o peroxinitrito inibe a agregação induzida por colágeno (Moro et al., 1994; Brown et al., 1998).

A superprodução de ERNs é chamada de estresse nitrosativo (Klatt e Lamas, 2000; Ridnour et al, 2004), que pode ocorrer também quando o sistema não consegue neutralizar e eliminar o excesso de ERNs produzido. O estresse nitrosativo é capaz de levar às reações de nitrosilação e nitração que podem alterar a estrutura das proteínas e inibir ou aumentar sua função normal (Valko et al, 2006; Marcondes et al, 2001).

Já está bem estabelecido que o peroxinitrito é um dos agentes químicos responsáveis pela nitração de resíduos de tirosina levando, na maioria das vezes, a inibição da atividade de diferentes enzimas. O peroxinitrito *in vitro* inibe a atividade enzimática da Mn superóxido dismutase (MacMillan-Crow et al., 1996), da prostaciclina sintase (Zou et al., 1997) e da tirosina hidroxilase (Ara et al., 1998), sendo este efeito sempre relacionado com a nitração de resíduos de tirosina. Proteínas nitradas também podem ser observadas em diferentes patologias e modelos experimentais. A nitração da enzima 3-cetoacil-CoA transferase foi observada em rins de ratos tratados com LPS (Marcondes et al., 2001) e em coração de ratos diabéticos (Turko et al., 2001) com conseqüente diminuição da atividade enzimática. Nosso grupo demonstrou que o efeito inibitório do SNP e Sin-1 na adesão de plaquetas ao fibrinogênio foi decorrente da formação de peroxinitrito e, provavelmente, via nitração da alfa-actinina (Marcondes et al., 2006, Cardoso et al, 2010).

Entre as espécies reativas de oxigênio podemos citar o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). Uma variedade de enzimas no organismo é capaz de produzir EROs como a nicotinamida adenosina dinucleotídeo (fosfato) oxidase (NADPH oxidase), isoformas 1 e 2 da cicloxigenase (COX), isoforma 2C9 do citocromo P450 (CYP2C9), xantina oxidase (XO), xantina óxido redutase (XOR) e xantina desidrogenase (XD) (Krötz et al, 2002). Evidências sugerem que a NADPH oxidase seja a principal fonte de geração de O_2^- (Somers et al, 2000; Krause, 2007). O protótipo das NADPH oxidases, ou NOX2, foi originalmente descrita em leucócitos e é constituída de duas subunidades na membrana citoplasmática, a gp91phox e a p22phox, que juntas formam o flavocitocromo b558 e três subunidades citosólicas- a p47phox, p67phox e a p40phox, além da trifosfatase da guanosina (GTPase) (Gianni et al, 2008; Bäumer et al, 2008). A ativação da enzima envolve a fosforilação e a translocação dos componentes citosólicos para o flavocitocromo b₅₅₈. (Bokock, 1994). Hoje são descritas 7 enzimas pertencentes a família das NADPH oxidases – as NOX 1-5 e as Duox 1 e 2 (Gianni et al, 2008)

A produção do O_2^- ocorre mais comumente na mitocôndria. A cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria é a principal fonte de ATP nas células sendo, portanto, fundamental para a vida e é nesta etapa que ocorre o “escape” de elétrons com concomitante formação de O_2^- . (Kovacic et al, 2005). Na realidade 1-3% de todos os elétrons da cadeia de transporte de elétrons “escapam” para gerar o ânion superóxido ao invés de contribuir para a redução do oxigênio para a formação de água (Miller et al, 2005).

O H_2O_2 pode ser formado pela superóxido desmutase (SOD) e rapidamente degradado ou utilizado pelas enzimas catalase e glutathione peroxidase (Krötz et al, 2002). Ele é mais estável que os outros EROs e é permeável às membranas celulares (Ferreira e Matsubara, 1997; Norberg e Arnér, 2001). Os peroxissomos produzem grande quantidade de H_2O_2 pela ação de oxidases envolvidas no catabolismo de aminoácidos e na oxidação de ácidos graxos (Lehninger et al, 2000). Essa organela também contém catalase, que decompõe H_2O_2 , prevenindo o acúmulo deste composto tóxico. Quando há danos nos peroxissomos, o consumo de H_2O_2 se torna prejudicado e sua liberação no citosol contribui significativamente para o estresse oxidativo (Krötz et al, 2002; Valko et al, 2006).

O $\cdot OH$ é altamente reativo e com meia-vida em solução aquosa de 1ns. O $\cdot OH$ pode ser gerado pela mieloperoxidase ou reações catalisadas pelo ferro. A reação de Fenton é uma das principais vias de geração de $\cdot OH$ *in vivo* através da oxidação de Fe^{+2} a Fe^{+3} e decomposição do H_2O_2 ($Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + \cdot OH + OH^-$).

A exposição a radicais livres tem levado os organismos a desenvolverem uma série de mecanismos de defesa (Cadenas et al, 1997) como substâncias e enzimas antioxidantes. As enzimas de defesas antioxidantes incluem a superóxido desmutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Os antioxidantes não enzimáticos são representados pelo ácido ascórbico (Vitamina C), o α -tocoferol (Vitamina E), a glutathione (GSH), carotenóides, flavonóides entre outros (Masella et al, 2005).

Sob condições fisiológicas, ocorre um equilíbrio entre a formação de espécies reativas e a remoção destas substâncias por compostos antioxidantes e enzimas (Schafer e Buettner, 2001). Em alguns processos patológicos, como na sepse, há uma quebra neste equilíbrio podendo haver aumento excessivo da geração de espécies reativas e/ou redução dos mecanismos antioxidantes (Bhattacharya, 2004). Este estado é chamado de estresse oxidativo e pode resultar em danos celulares e teciduais dependendo da intensidade e se ocorrer por tempo prolongado (Freedman, 2008). A proporção entre glutathione reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é uma importante medida do estresse oxidativo no organismo. (Masella, 2005; Nogueira, 2004). A redução dos níveis de GSH indica uma diminuição na capacidade antioxidante da célula e é associada ao envelhecimento, diabetes melitus, inflamação e doenças neurodegenerativas (Thomas e Mallis, 2001; Dröge, 2002; Drake, 2002).

Há várias evidências indicando a participação de EROs na patogênese da sepse levando a disfunção múltipla de órgãos (Keen et al, 1991, Bhattacharyya et al, 2004). Pacientes com sepse apresentam aumento da atividade da enzima xantina oxidase, bem como dos níveis plasmáticos de malondialdeído (marcador do estresse oxidativo), quando comparado a indivíduos normais (Galley et al, 1996; Huet et al, 2007). No coração, a atividade da NADPH oxidase e a liberação de EROs são aumentadas em resposta ao LPS (Khadour et al, 2002; Ben-Shaul et al, 2001). Em 1999, Salvemini et al demonstraram que o O_2^- e o peroxinitrito têm um papel importante na injúria intestinal observada durante a endotoxemia. Foi demonstrado que o antioxidante N-acetilcisteína inibe o aumento da expressão de TNF-alfa em cardiomiócitos, a qual está intimamente relacionada à falência cardíaca observada na sepse (Shang et al, 2006). Além disso, Wu et al, 2007 verificaram que o LPS e o $INF\gamma$ aumentam a atividade da NADPH oxidase e a expressão da $p47^{phox}$ em células endoteliais microvasculares.

O primeiro estudo mostrando que as plaquetas liberam EROs foi feito por Marcus et al em 1977. Alguns autores sugerem que, assim como os neutrófilos, as EROs derivadas de plaquetas estão

envolvidas no mecanismo de defesa e contribuem para a morte de parasitas e bactérias (Cesbron et al, 1987).

Semelhante a outras células do organismo, as plaquetas possuem diversas fontes enzimáticas de produção de EROs como a cicloxigenase (COX), a xantina oxidase (XO), a cadeia de transportes de elétrons e a NADPH oxidase, sendo que esta última tem ganhado maior atenção por ser ativada por agonistas que também induzem a ativação plaquetária como o colágeno e ácido araquidônico (Krötz et al, 2002; Pignatelli et al, 2003). O colágeno induz a liberação de ânion superóxido pela NADPH oxidase de plaquetas que por sua vez aumenta a liberação de ADP, resultando no aumento de recrutamento de plaquetas. (Krötz et al, 2002). As primeiras evidências de expressão de NADPH oxidase em plaquetas surgiram em 2001 por Seno et al que detectaram as subunidades p22phox e p67phox em plaquetas lisadas humanas. Mais tarde, foram encontradas as subunidades gp91phox e p47phox (Pignatelli et al, 2004). Sabe-se que a ativação plaquetária está associada à ativação da subunidade gp91phox da enzima (Stokes et al, 2007).

Trabalhos têm sugerido que as EROs podem ter um papel modulatório na atividade plaquetária (Krötz et al, 2004). O O_2^- pode aumentar a agregação induzida por trombina, colágeno, ADP ou ácido araquidônico (Handin et al, 1977). Já foi demonstrado também que a produção de EROs aumenta a ativação do receptor de fibrinogênio em plaquetas (Pignatelli et al, 2004). O inibidor da NADPH oxidase e o sequestrador de ânion superóxido também reduzem a agregação plaquetária (Begonja et al, 2005). Além disso, a SOD, ao diminuir a disponibilidade de superóxido, promove o aumento de NO plaquetário e assim a inibição da agregação, indicando que o superóxido pode modular a ação inibitória do NO na agregação plaquetária (Clutton et al, 2004). Nosso grupo mostrou recentemente que ratos tratados com LPS 8h e 48h apresentaram um aumento na liberação de EROs, mas que este aumento não é responsável pela diminuição da agregação plaquetária desses animais (Lopes-Pires et al, 2011). Neste mesmo trabalho foi verificado que a NADPH oxidase é a principal enzima geradora de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS (Lopes-Pires et al, 2011).

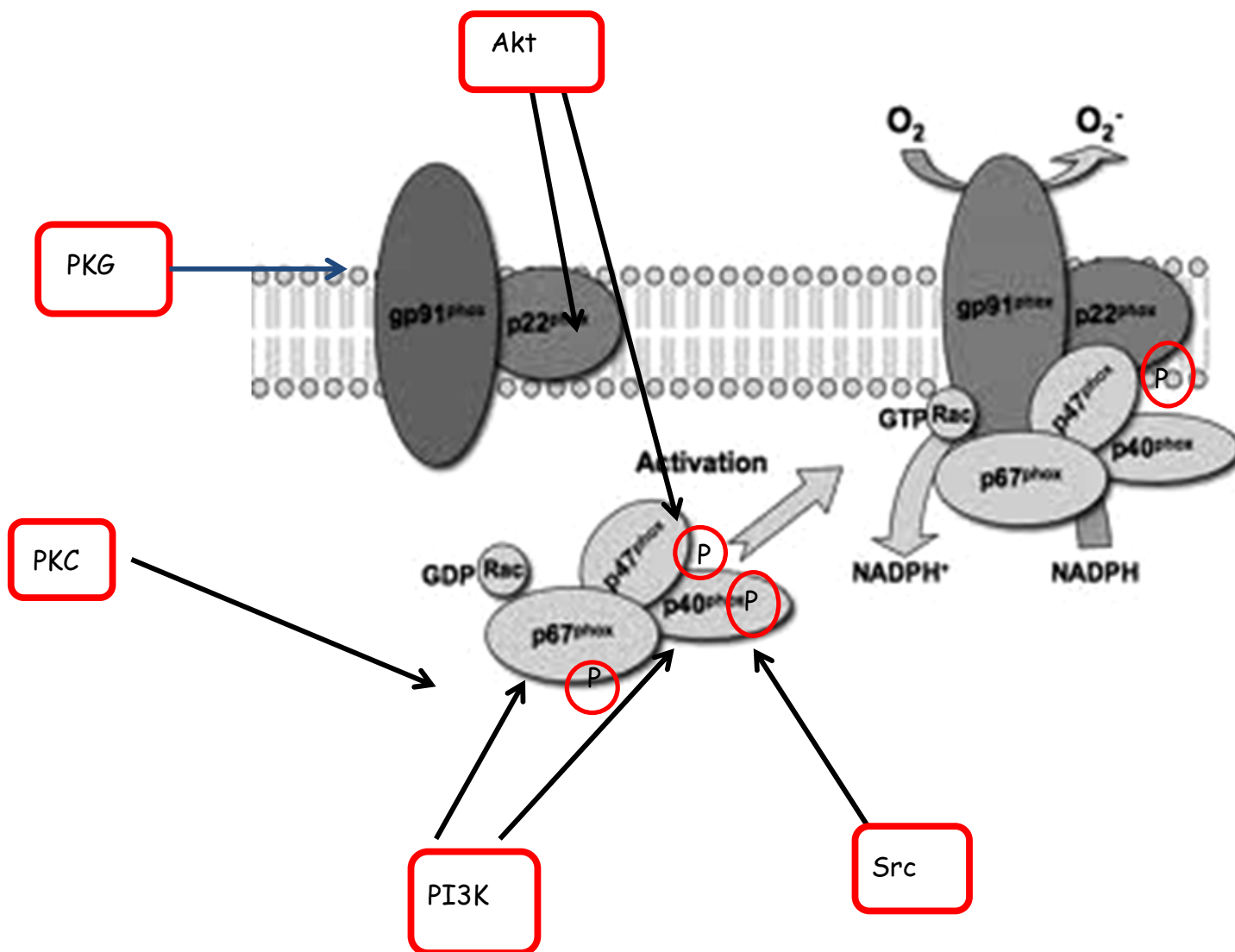
Alguns trabalhos mostram que a PI3Ke a c-Src estão envolvidas na modulação da atividade da NADPH oxidase (Clutton et al, 2004). Estudos em células vasculares humanas e de aorta de ratos demonstraram que as EROs agem como segundo mensageiro da angiotensina II sendo assim, esta depende da estimulação da NADPH oxidase e que esta é regulada pela c-Src (Touyz et al, 2003). Em células endoteliais, a ativação NADPH oxidase depende da fosforilação da p47-phox pela Src (Chowdhury et al, 2005). Em plaquetas de ratos, a PI3K regula a liberação de superóxido da NADPH

oxidase (Clutton et al, 2004) e em plaquetas humanas, a ativação da NADPH oxidase e a translocação das subunidades p47phox e Rac-1 mostraram ser dependentes da atividade da PI3K (Bäumer et al, 2008).

Outros trabalhos sugerem que a PKC é o maior mediador na ativação da NADPH oxidase. A ativação da NADPH oxidase foi diretamente estimulada pela PKC, após utilização de forbol éster, um potente indutor da produção de O_2^- (Segal e Jones, 1979; Suzuki e Lehrer; 1980). Em linfoblastos humanos foi verificado que a mitocôndria regula a ativação da NADPH oxidase via PKC (Dikalov et al, 1999). Em plaquetas, a angiotensina II estimula a produção de superóxido através da ativação da NADPH oxidase via receptor AT1 e PKC (Plumb et al, 2005).

A Akt também está envolvida na ativação da NADPH oxidase. Em leucócitos, a Akt ativa a NADPH oxidase através da fosforilação das serinas S304e S328 da p47 phox (Hoyal et al 2003) e Edderkaoui e grupo mostraram que a ativação da NADPH oxidase em células cancerosas de pâncreas se dá via Akt-p22 phox (Edderkaoui et al, 2011).

NADPH oxidase



Uma vez que há diminuição da agregação plaquetária e um aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio após tratamento de ratos com LPS, este trabalho foi desenvolvido

a fim de tentar esclarecer as vias de sinalizações envolvidas na atividade plaquetária na sepse experimental.

2 Objetivo

Tendo em vista o papel importante das plaquetas na sepse, uma condição que ainda representa uma das principais causas de morte em hospitais, o objetivo principal desse trabalho foi investigar os mecanismos envolvidos na modulação da reatividade plaquetária na sepse experimental induzida pelo tratamento de ratos com lipopolissacarídeo.

2.1 Objetivos específicos

- Estudar o papel do óxido nítrico na modulação da agregação plaquetária e na ativação da NADPH oxidase
- Investigar o papel das enzimas da família Src, da Akt, da PKC e da PI3K na agregação plaquetária e na ativação da NADPH oxidase

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, protocolo número 2097-1). Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia (Faculdade de Ciências Médicas), onde foram mantidos a 24°C, com iluminação diária de 12 h e com água e alimentação *ad libitum*.

3.2 Tratamento com LPS

Ratos Wistar machos (270-340g) receberam uma única injeção i.p. (1 mg/kg rato) de solução de LPS de *Escherichia coli* L4130. Após 6h e 48h do tratamento com LPS 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 artéria aorta. Ratos controles receberam uma injeção i.p. de solução fisiológica de mesmo volume que aqueles tratados com LPS.

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 13 min a 800 g. O precipitado plaquetário foi ressuspensado em tampão de lavagem e novamente centrifugado a 800 g por 13 min. Finalmente, as plaquetas foram ressuspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de Ca^{2+} e o número de plaquetas foi ajustado para $1,2 \times 10^8$ 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.

3.4 Agregação plaquetária

A solução de plaquetária (400µl) foi transferida para a cubeta 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). As plaquetas foram incubadas com inibidor da Src- PP2 (10µM); inibidor da PI3K- Wortmanin (100 nM); inibidor da PKC- GF 109203X (10µM); inibidor da guanilil ciclase- ODQ (25µM); inibidor da PKG- Rp-8-Br (25µM), 1-inibidor da Akt- API (20µM) ou com sequestrador de peroxinitrito- Galato de (-) Epigallocatequina (ECG-10µM) por 3 minutos antes da adição de ADP (10µM). A agregação foi monitorada por 10 min.

3.5 Determinação de EROS por citometria de fluxo

A determinação dos níveis de EROs em plaquetas foi realizada como descrito por Swith e Weidemann, 1993. Brevemente, à suspensão de plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi adicionado 5µM de 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA). A suspensão plaquetária (500µl) foi transferida para os tubos de citometria e incubada com ADP (10 µM) por 20 min. As plaquetas foram pré-incubadas com PP2 (10µM); Wortmanin (100 nM); GF 109203X (10µM); ODQ (25µM), API-1 (20µM) ou Rp-8-Br (25µM) por 15 min antes da adição do DCFH-DA.

Em seguida, a suspensão plaquetária foi centrifugada a 800g em temperatura ambiente por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o pellet plaquetário ressuspenso em 500 µl de solução de Krebs-Ringer. Uma amostra contendo somente a suspensão plaquetária, na ausência de DCFH-DA, foi utilizada como controle negativo, enquanto que o controle positivo foi realizado adicionando-se H₂O₂ (8mM) à suspensão. A liberação de EROS foi quantificada usando um citômetro de fluxo (FACSCalibur Becton Dickinson, NJ, EUA) equipado com 488nm wavelength argon laser, 525 e 575nm band pass filters. As plaquetas foram identificadas pelos sinais *forward and side scatter*. Dez mil eventos específicos plaquetários foram analisados pelo citômetro.

3.6 Western blotting

As amostras provenientes de plaquetas de ratos controles e tratados com LPS ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram ativadas com ADP ($10\mu\text{M}$) e centrifugadas a $10,000g$ por 10 min à 4°C e o precipitado foi diluído em tampão dissociante (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8/SDS 2%/glicerol 10%/α-mercaptoetanol 2%/azul de bromofenol 0.1%) de acordo com a determinação de proteína da amostra, realizada pelo método de Lowry. A eletroforese das proteínas contidas nas amostras foi realizada em gel de poliacrilamida-SDS (10%) e em seguida as membranas foram transferidas para membranas de PVDF por 90 min a 100 mA. As membranas foram bloqueadas por 30 min, a temperatura ambiente, com BSA 1% em TBS-T (Tris 200 mM, NaCl 1.5 M, pH 7.6 e Tween 0.1%) em seguida incubadas por 16h (40°C) com BSA 1% em TBS-T contendo anticorpo primário: anti-cSrc quinase, anti-fosfo (Tyr 416)-c-Src; anti-nitrotirosina; anti-Akt, anti-fosfo (Thr308)-Akt; anti- fosfo Ser 345; anti- p47-phox. 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 usando quimioluminescência.

3.7 Determinação de TNF-α

A concentração plasmática de TNF-α foi determinada utilizando o método ELISA kit de BioLegend (San Diego, EUA).

3.8 Determinação de GMPc intraplaquetário

As plaquetas ($1,2 \times 10^8$ 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 incubadas ou não com inibidor de PKC, GF209103X (10 μ M) por 15 min e foram ativadas com ADP (10 μ M). A reação foi interrompida 30 min após a adição de ADP por etanol absoluto acidificado gelado em uma concentração final de 67% (v/v) e as amostras foram rigorosamente agitadas por 30s.

As amostras foram incubadas no gelo por 30 min e centrifugadas a 4000g por 30 min a 4⁰C. 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 55-60⁰C em banho-maria sob uma corrente de nitrogênio. As amostras foram armazenadas a -20⁰C 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.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ 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 do LPS na concentração plasmática de TNF- α em ratos

A figura 1 mostra que os níveis plasmáticos de TNF- α de ratos 6h e 48h após tratamento com LPS (1mg/Kg, i.p.) foram 12 e 48 vezes maior que em ratos tratados com salina, respectivamente.

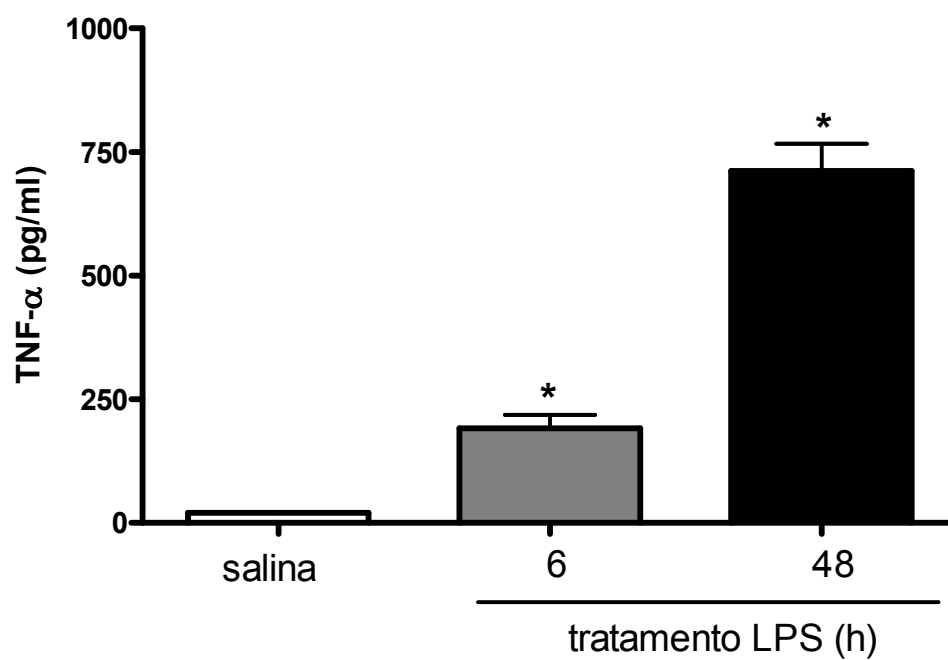


Figura 1:
Efeito do LPS na concentração plasmática de TNF- α em ratos. A determi

nação da concentração de TNF- α foi realizada no plasma de animais tratados com salina, 6h ou 48h após o tratamento com LPS (1mg/Kg, i.p.) pelo método ELISA. *P <0,05 comparado com o grupo tratado com salina. n=4.

4.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA MODULAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DE RATOS TRATADOS COM LPS

4.2.1 Efeito da inibição da Src na agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS

A figura 2 mostra que a agregação plaquetária induzida por ADP 10 μ M de animais tratados 6h e 48h com LPS, foi significativamente reduzida quando comparada à agregação dos animais tratados com salina (redução de 65% e 51% da agregação de ratos 6h e 48h após o tratamento com LPS, respectivamente). A incubação de plaquetas por 3 min com inibidor não seletivo das enzimas da família Src, PP2 (10 μ M), reduziu significativamente a agregação do grupo tratado com salina (redução de 26%), mas não modificou a agregação plaquetária dos grupos tratados com LPS, seja em 6h ou 48h (figura 2).

Conforme mostra a figura 3, a intensidade das bandas proteicas correspondentes a relação P-(Tyr416)-Src/c-Src de plaquetas de ratos injetados 6h e 48h com LPS não apresentou-se diferente do grupo salina. A análise do western blotting de plaquetas ativadas com ADP (10 μ M), provenientes de ratos injetados com salina ou com LPS (6h e 48h), mostrou claramente uma banda imunorreativa para c-Src de mesma intensidade. A fosforilação da c-Src no resíduo de Tyr416, que indica ativação da enzima, também foi semelhante em plaquetas de ratos tratados com salina ou LPS, como mostrado pela razão da densitometria das bandas correspondentes a c-Src fosforilada e não fosforilada (figura 3B).

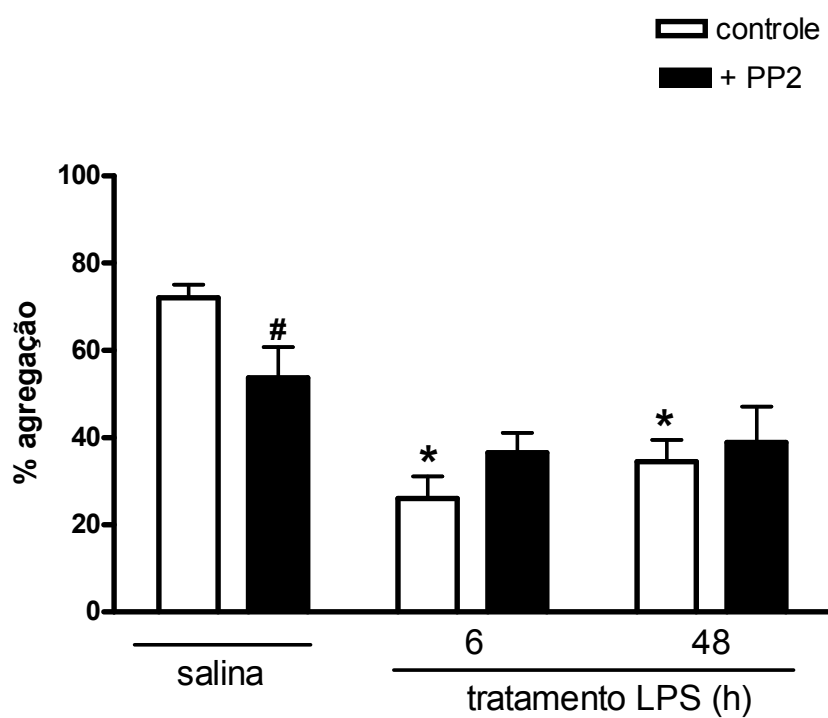


Figura 2: Efeito da inibição da Src na agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS. O sangue dos ratos injetados com salina ou após 6h e 48h da injeção com LPS (1 mg/kg) foi coletado. Plaquetas lavadas (1.2×10^8 plaquetas / ml) foram pré-incubadas por 3 min com PP2 10 μ M ou com

igual volume de DMSO 0.1% antes de serem ativadas com ADP (10 μ M). * P <0,05 comparado com o controle do grupo salina. # P <0,05 comparado com o respectivo controle na ausência de PP2. N=3-6 animais.

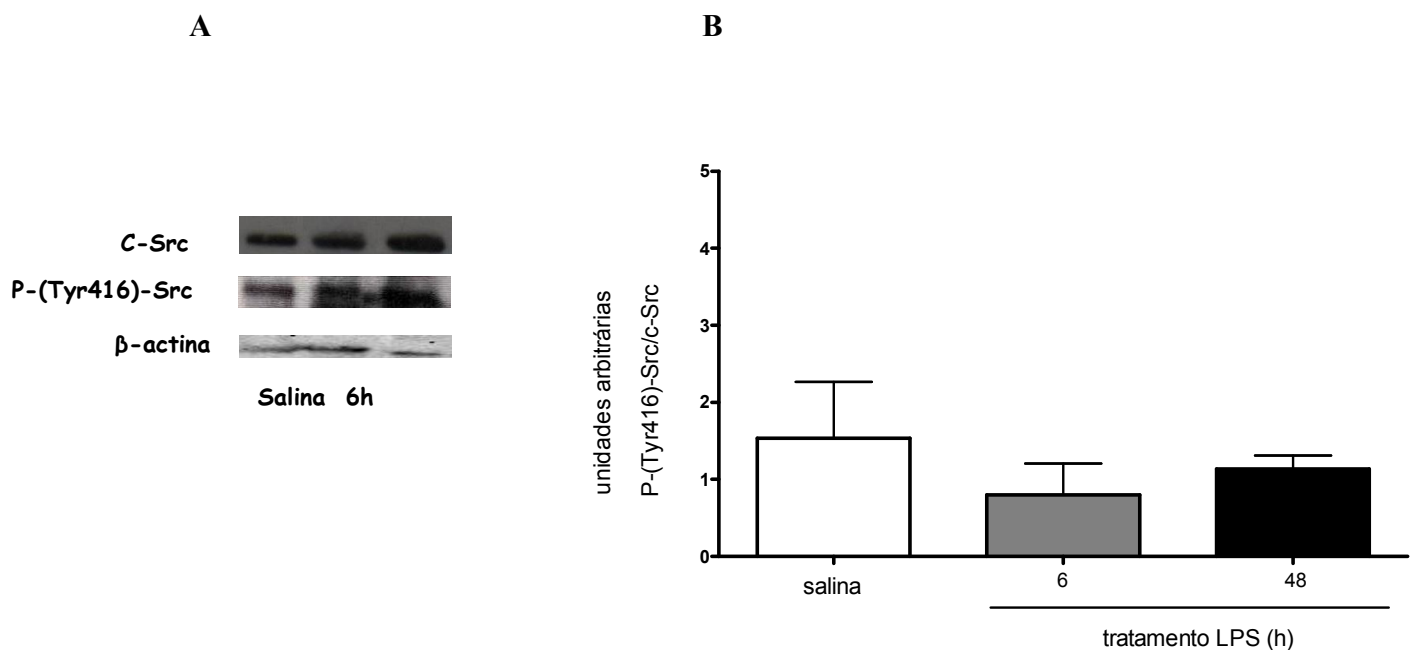


Figura 3: Detecção das enzimas c-Src e P-(Tyr 416)-Src em plaquetas de ratos tratados com salina ou com LPS. As amostras provenientes de plaquetas de ratos controles e tratados 6h e 48h com LPS (1,2 x 10⁸ plaquetas/ml) foram ativadas com ADP (10 μ M), centrifugadas e o precipitado foi

congelado até o momento de uso. Foi realizada a determinação protéica pelo método de Lowry e 25µg de proteína, juntamente com o tampão dissociante, foi adicionado em cada poço para realização da eletroforese. A c-Src e a P-Src foram identificadas por western blotting utilizando os anticorpos primários anti-c-Src e anti fosfo-(Tyr 416)-Src (diluição 1:2000). O painel A mostra um blotting representativo da detecção das bandas imunorreativas para a c-Src e P-(Tyr416)-Src em plaquetas de 3 animais diferentes de cada grupo. O gráfico B mostra a razão da análise densitométrica das bandas correspondentes a Src fosforilada e não fosforilada.

4.2.2 Efeito da inibição da PI3K e da Akt na agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS

A figura 4 mostra que a agregação de plaquetas de ratos tratados com salina foi reduzida 56% pela incubação com inibidor da PI3K, wortmannin (100nM), em comparação à agregação na ausência do inibidor. Por outro lado, a incubação com inibidor da Akt, API-1 (20µM), não alterou a agregação plaquetária.

De modo semelhante ao observado com o grupo controle, a agregação plaquetária de ratos 48h após a injeção de LPS foi reduzida ainda mais pelo wortmannin (redução de 51%) e não foi afetada pelo API-1. Entretanto, o efeito inibitório do LPS em 6h na agregação plaquetária não foi modificado pelo wortmannin, mas foi prevenido pela inibição da Akt (figura 4).

No ensaio de western blotting de plaquetas ativadas com ADP (10µM) de ratos injetados com salina, foi possível detectar a banda imunorreativa para a enzima Akt e sua discreta fosforilação no resíduo Thr 308 (figura 5A). O tratamento dos ratos com LPS em 6h e 48h levou a um aumento significativo da intensidade da banda protéica correspondente a P-(Thr308)-Akt e Akt em plaquetas

de tal forma que a relação P-(Thr308)-Akt/Akt foi aumentada em 3.5 e 2.3 vezes para os grupos tratados em 6h e 48h com LPS, respectivamente, em relação ao grupo tratado com salina, como mostrado por análise densitométrica das referidas bandas (figura 5B).

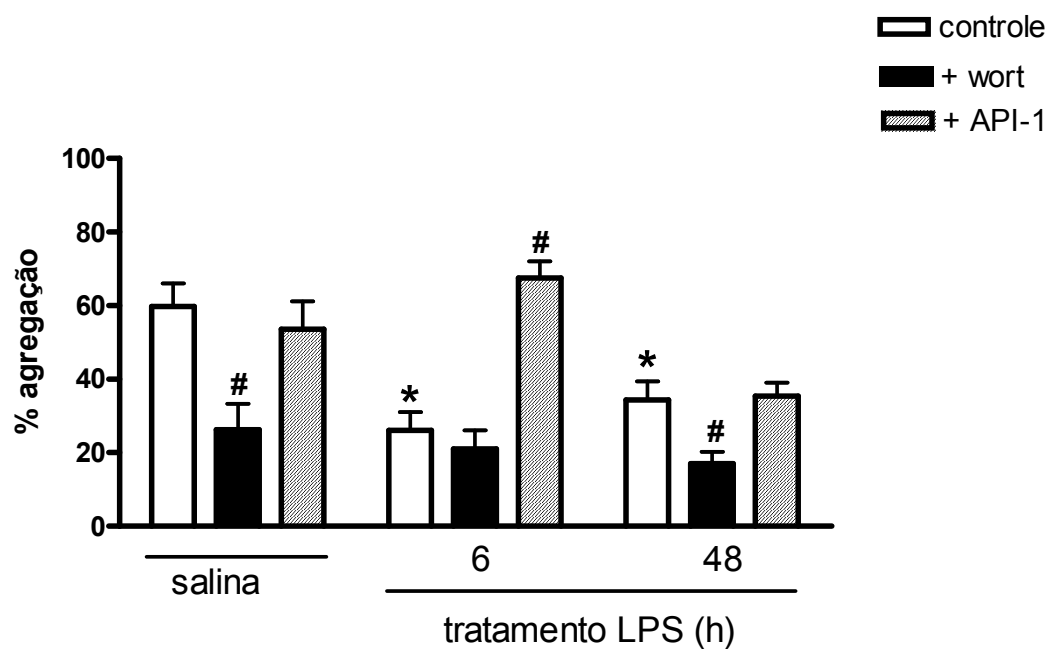


Figura 4:
Efeito da
inibição
da PI3K e
da Akt na
agregação
de
plaquetas
de ratos

tratados com LPS. O sangue dos ratos injetados com salina ou após 6h e 48h da injeção com LPS (1mg /kg) foi coletado. Plaquetas lavadas (1.2×10^8 plaquetas / ml) foram pré-incubadas por 3 min com wortmannin (100nM), API-1 (20 μ M) ou com igual volume de DMSO 0.1%. A agregação

plaquetária foi induzida por ADP (10 μ M). * P <0,05 comparado com o controle do grupo salina. # P <0,05 comparado com o respectivo controle na ausência dos inibidores enzimáticos. N=3-6 animais.

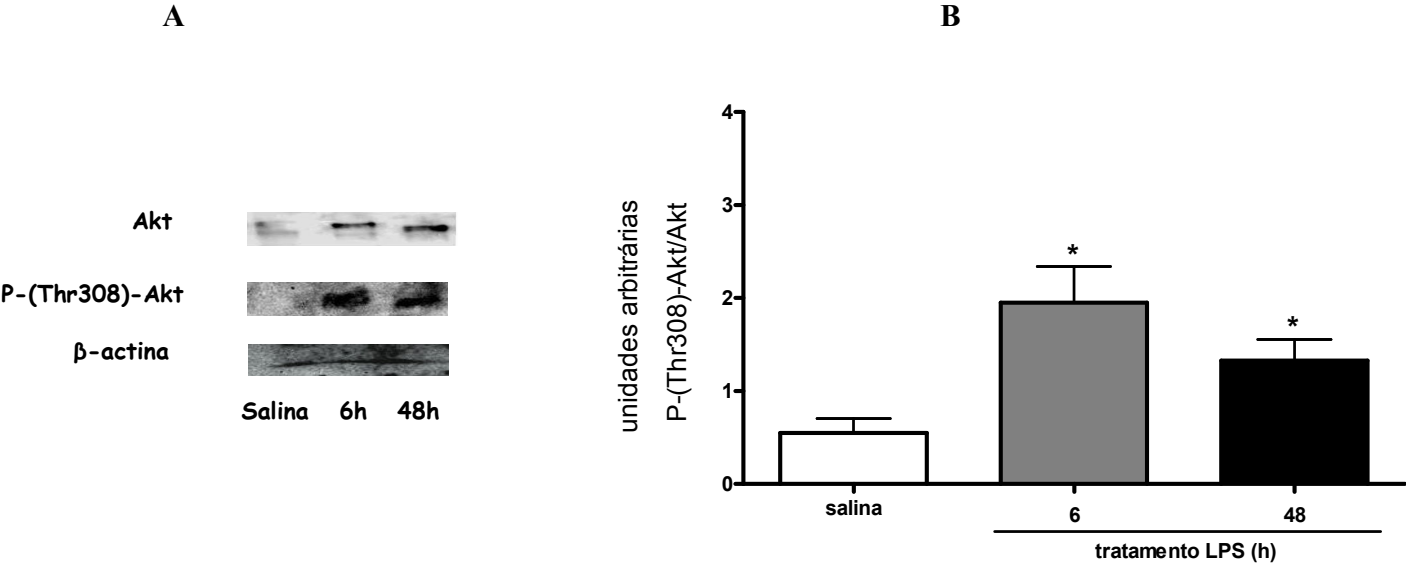


Figura 5: Detecção das enzima Akt e P-(Thr308)-Akt em plaquetas de ratos tratados com salina ou com LPS. As amostras provenientes de plaquetas de ratos controles e tratados com LPS 6h e 48h (1.2×10^8 plaquetas/ml) foram ativadas com ADP ($10\mu\text{M}$), centrifugadas e o precipitado foi congelado até o momento de uso. Foi realizada a determinação protéica pelo método de Lowry e $50\mu\text{g}$ de proteína, juntamente com o tampão dissociante, foi adicionado em cada poço para realização da eletroforese. A Akt e a P-(Thr308)-Akt foram identificadas por western blotting utilizando anticorpo primário anti-Akt e anti P-(Thr308)-Akt (diluição 1:2000). O painel A mostra um blotting representativo para a Akt e fosfo-(Thr308)-Akt em plaquetas de 3 animais diferentes de cada grupo. O painel B mostra a razão entre as densitometrias obtidas das bandas imunorreativas para p-(Thr308)-Akt/Akt. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina.

4.2.3 Determinação da presença de proteínas contendo resíduos de 3-nitrotirosina em plaquetas de ratos tratados com LPS

No ensaio de western blotting de plaquetas ativadas com ADP ($10\mu\text{M}$) de ratos injetados com salina foi detectada claramente bandas imunorreativas para proteínas contendo resíduos de 3-nitrotirosina com pesos moleculares de aproximadamente 78 kDa, 60 kDa, 52 kDa e 38 kDa (figura 6A). O tratamento dos ratos com LPS em 6h ou 48h levou a um aumento da intensidade média das bandas correspondentes a proteínas nitradas em plaquetas por volta de 3.3 vezes quando comparada com a de ratos tratados com salina (figura 6B).

A incubação de plaquetas com o sequestrador de peroxinitrito, epigalacatequina galato (ECG, $10\mu\text{M}$) por 3 min não modificou a agregação induzida por ADP ($10\mu\text{M}$) do grupo tratado com salina

assim como do grupo 6h após o tratamento com LPS (figura 7). Entretanto, o efeito inibitório do LPS em 48h na agregação plaquetária foi prevenido pelo sequestrador de peroxinitrito (figura7).

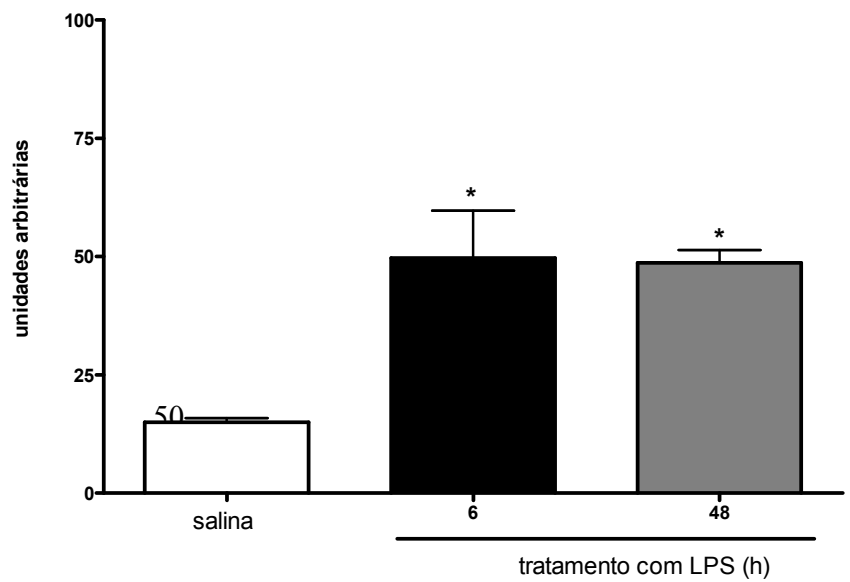
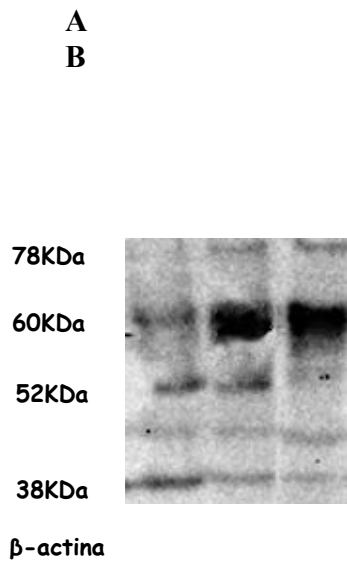




Figura 6: Detecção de proteínas contendo resíduos de nitrotirosina em plaquetas de ratos tratados com LPS. As amostras provenientes de plaquetas de ratos controles e tratados com LPS 6h ou 48h ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram ativadas com ADP ($10\mu\text{M}$), centrifugadas e o precipitado foi congelado até o momento de uso. Foi realizada a determinação protéica pelo método de Lowry e $25\mu\text{g}$ de proteína, juntamente com o tampão dissociante foi adicionado em cada poço para realização da eletroforese. A nitração foi identificada por western blotting utilizando o anticorpo primário anti-nitrotirosina (diluição 1:2000). O painel A mostra um blotting representativo de proteínas contendo nitrotirosina de plaquetas de 3 animais diferentes de cada grupo. O painel B mostra o resultado da densitometria feita das bandas imunorreativas. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina.

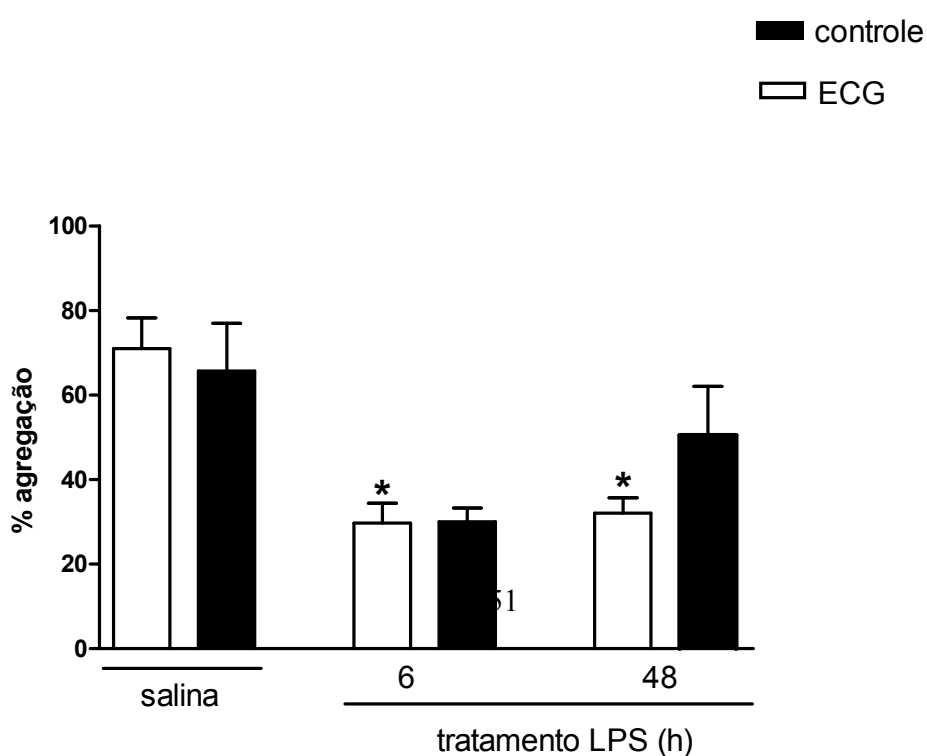
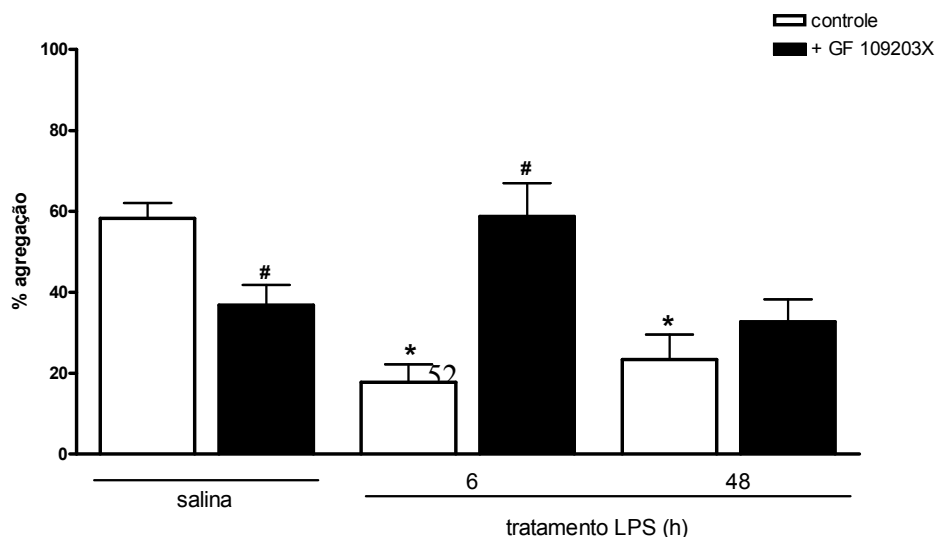


Figura 7: Efeito do sequestrador de peroxinitrito na agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS. O sangue dos ratos injetados com salina ou após 6h e 48h da injeção com LPS (1mg /kg) foi coletado. Plaquetas lavadas (1.2×10^8 plaquetas / ml) foram pré-incubadas por 3 min com ECG (10 μ M). A agregação plaquetária foi induzida por ADP (10 μ M). * P <0,05 comparado com o controle do grupo salina. N=3-6 animais

4.2.4 Efeito da inibição da PKC na agregação plaquetária e na formação de GMPc em plaquetas de ratos tratados com LPS

A incubação por 3 min de plaquetas de ratos injetados com salina com o inibidor da PKC GF109203X (10 μ M) inibiu significativamente a agregação induzida por ADP (redução de 38%). Por outro lado, a inibição de PKC aumentou significativamente a agregação plaquetária de ratos 6h após a injeção com LPS (aumento de 70% comparado à agregação na ausência de GF109203X). A agregação plaquetária de ratos tratados com LPS em 48h não foi modificada pelo GF109203X (figura 8).

O
tratamento
dos ratos
com LPS,
seja em 6h
ou 48h,



aumentou significativamente os níveis de GMPc em plaquetas (4.7 e 3.3 vezes maior em 6h e 48h após injeção de LPS, respectivamente) quando comparado com o grupo injetado com salina (figura 9). Os níveis intraplaquetários de GMPc de ratos injetados com salina foram aumentados cerca de 4 vezes com a incubação de plaquetas por 15 min com GF109203X (10 μ M) (figura 9). De modo semelhante, o GF109203X aumentou ainda mais os níveis de GMPc em plaquetas de ratos tratados com LPS em 48h. Entretanto, a concentração intraplaquetária de GMPc em ratos tratados com LPS por 6h foi reduzida para níveis semelhantes aos observados no grupo salina pela incubação com GF109203X (figura X).

Figura 8: Efeito da inibição da PKC na agregação plaquetária de ratos injetados com LPS.

O sangue dos ratos injetados com salina ou após 6h e 48h da injeção com LPS (1mg /kg) foi coletado. Plaquetas lavadas (1.2×10^8 plaquetas / ml) foram pré-incubadas por 3 min com o inibidor da PKC GF109203X (10 μ M) ou com igual volume de DMSO 0.1%. A agregação plaquetária foi induzida por ADP (10 μ M). *P <0,05 comparado com o controle do grupo salina. #P <0,05 comparado com respectivo controle sem GF109303X. N=3-7.

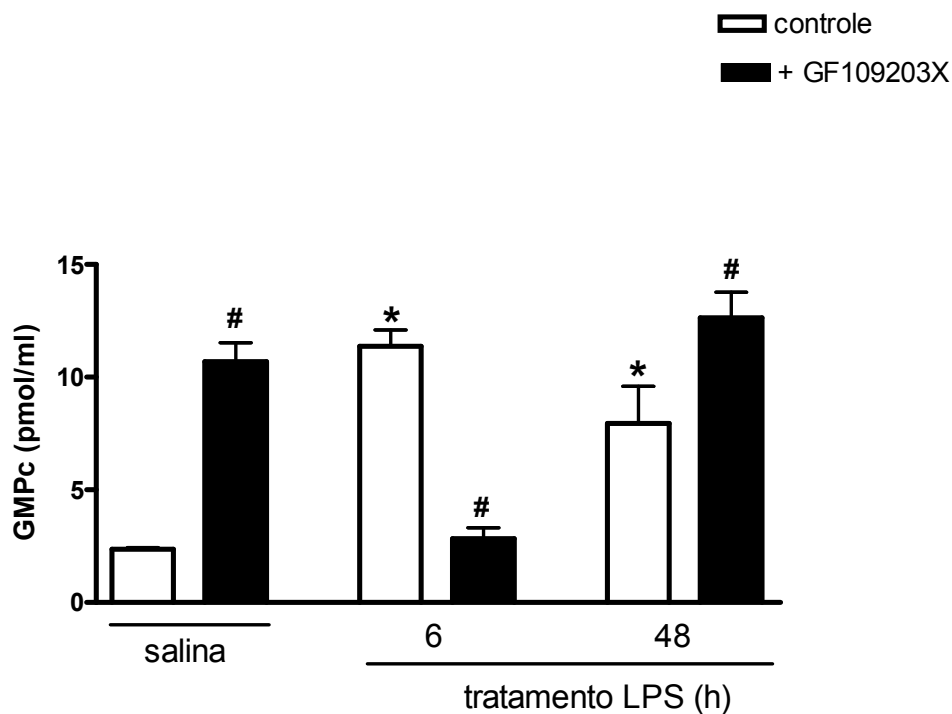


Figura 9: Efeito da inibição da PKC nos níveis de GMPC em plaquetas de ratos tratados com LPS. O sangue dos ratos injetados com salina ou após 6h e 48h da injeção com LPS (1mg /kg) foi coletado. Plaquetas lavadas (1.2×10^8 plaquetas / ml) foram pré-incubadas por 15 min com o inibidor da PKC GF109203X (10 μ M) ou com igual volume de DMSO 0.1%. Os níveis de GMPC foram determinados após 15min de ativação plaquetária com ADP 10 μ M. * P <0,05 comparado com o controle do grupo salina. #P <0,05 comparado com respectivo controle sem GF109203X. N=3-5.

4.2.5 Efeito da inibição da guanilil ciclase solúvel e da PKG na agregação plaquetária de ratos injetados com LPS

A pré-incubação por 3 min de plaquetas com o inibidor da guanilil ciclase, ODQ (10 μ M) preveniu, significativamente, o efeito inibitório do LPS em 6h na agregação (aumento de 66% comparado à agregação na ausência de ODQ). Entretanto, não modificou a agregação de plaquetas de ratos 48h após a injeção de LPS. A pré-incubação de ODQ com plaquetas de ratos injetados com salina reduziu discretamente a agregação (redução de 22%) (figura 10)

A incubação de plaquetas com o inibidor da PKG, Rp-8-Br (25 μ M) por 3 min não modificou a agregação induzida por ADP (10 μ M) do grupo tratado com salina assim como do grupo 48h após o tratamento com LPS. Entretanto, o efeito inibitório do LPS em 6h na agregação plaquetária foi prevenido pelo inibidor da PKG (figura 10).

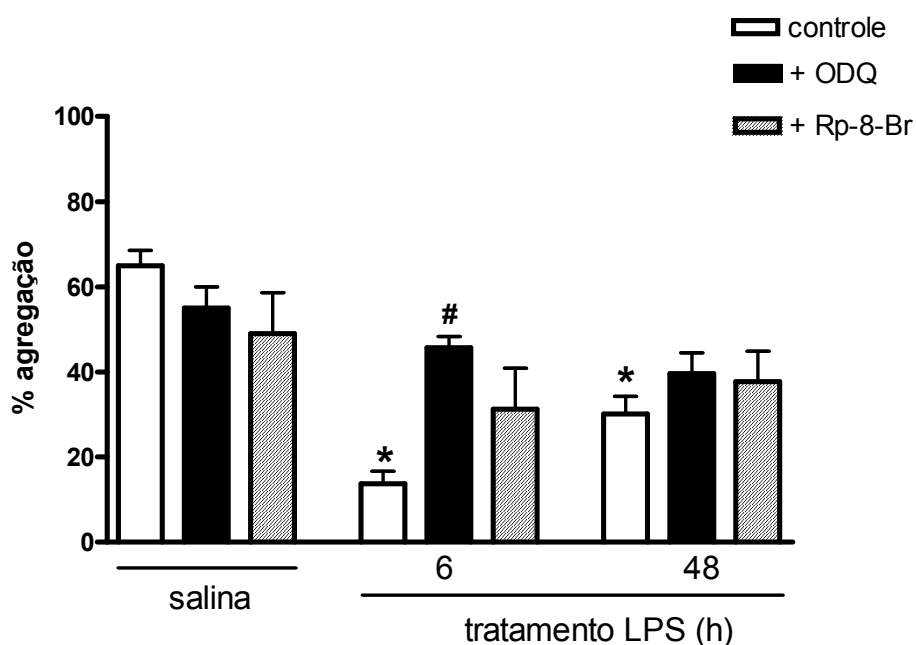


Figura 10: Efeito do inibidor da guanilil ciclase solúvel e da PKG na agregação plaquetária de ratos injetados com LPS. O sangue dos ratos injetados com salina ou após 6h e 48h da injeção com LPS (1mg /kg) foi coletado. Plaquetas lavadas (1.2×10^8 plaquetas / ml) foram pré-incubadas por 3 min com o inibidor da guanilil ciclase ODQ ($10 \mu\text{M}$), inibidor da PKG, Rp-8Br ($25 \mu\text{M}$) ou com igual volume de DMSO 0.1%. A agregação plaquetária foi induzida por ADP ($10 \mu\text{M}$). *P <0,05 comparado com o controle do grupo salina. #P <0,05 comparado com respectivo controle sem os inibidores. N=3-6.

4.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) EM PLAQUETÁRIA DE RATOS TRATADOS COM LPS

4.3.1 Efeito da inibição da PKC na geração de EROs e na fosforilação do resíduo Ser 345 da p47 phox em plaquetas de ratos tratados com LPS

O tratamento dos ratos com LPS aumentou significativamente a liberação de EROs de plaquetas ativadas quando comparada com o grupo salina (liberação em torno de 4.5 vezes maior nos grupos tratados com LPS) (figura 11). O aumento da geração de EROs em plaquetas ativadas de ratos tratados com LPS foi acompanhada pelo aumento da fosforilação da subunidade p47 phox da NADPH oxidase no resíduo de Ser 345 (aumento de 2.6 e 3 vezes em ratos 6h e 48h após tratamento de LPS, respectivamente, em comparação com o grupo salina) (figura 12).

A presença do inibidor da PKC, GF109203X ($10 \mu\text{M}$), não alterou a liberação de EROs de plaquetas dos ratos tratados com salina, mas diminuiu por volta de 42% e 26% a liberação de EROs de plaquetas de ratos injetados com LPS 6h e 48h respectivamente (figura 11). Além disso, o GF109203X reduziu em torno de 2 vezes a fosforilação do resíduo Ser 345 da p47 phox em ratos tratados com LPS, como mostra a análise densitométrica das bandas correspondentes a p47 phox e p-Ser 345 (figura 12). A incubação de plaquetas de ratos injetados com salina com GF109203X não modificou a fosforilação da p47 phox.

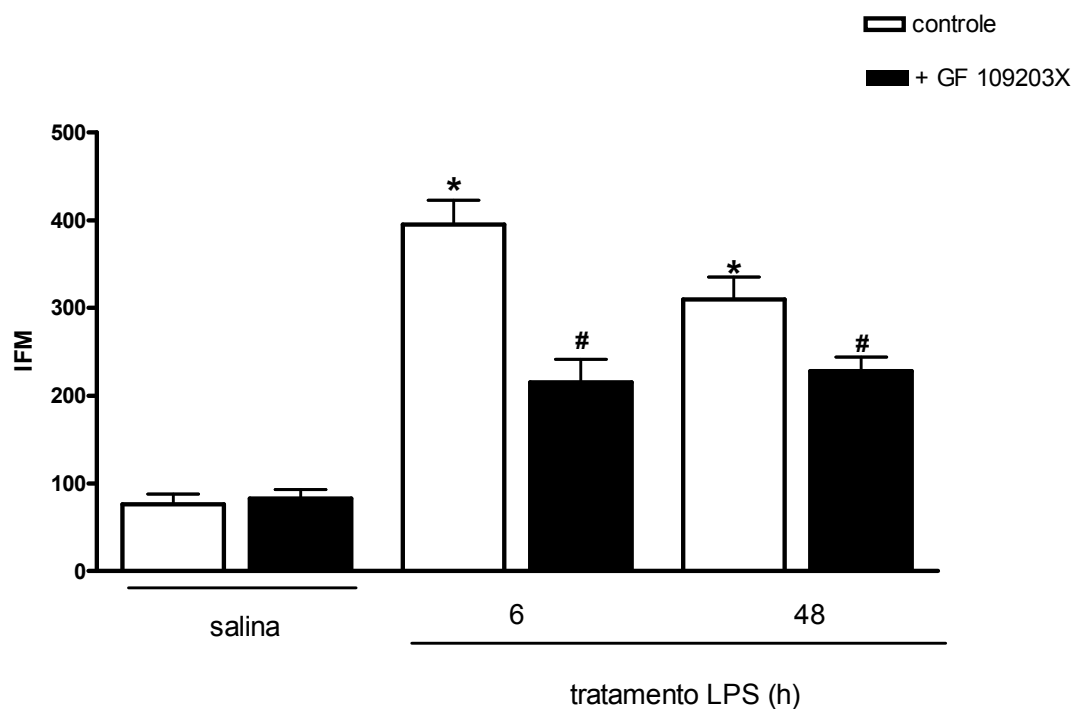


Figura 11: Efeito do inibidor da PKC na geração de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS. O sangue dos ratos injetados com salina ou após 6h e 48h da injeção com LPS (1mg /kg) foi coletado. As plaquetas lavadas (1.2×10^8 plaquetas / ml) foram pré-incubadas por 15 min com GF109203X (10 μ M) ou mesmo volume de DMSO (0.1%). A geração de EROs foi quantificada em plaquetas ativadas com ADP (10 μ M). *P <0,05 comparado com o controle do grupo salina. #P <0,05 comparado com respectivo controle na ausência do GF109203X. IFM = índice de fluorescência média. N=3-6.

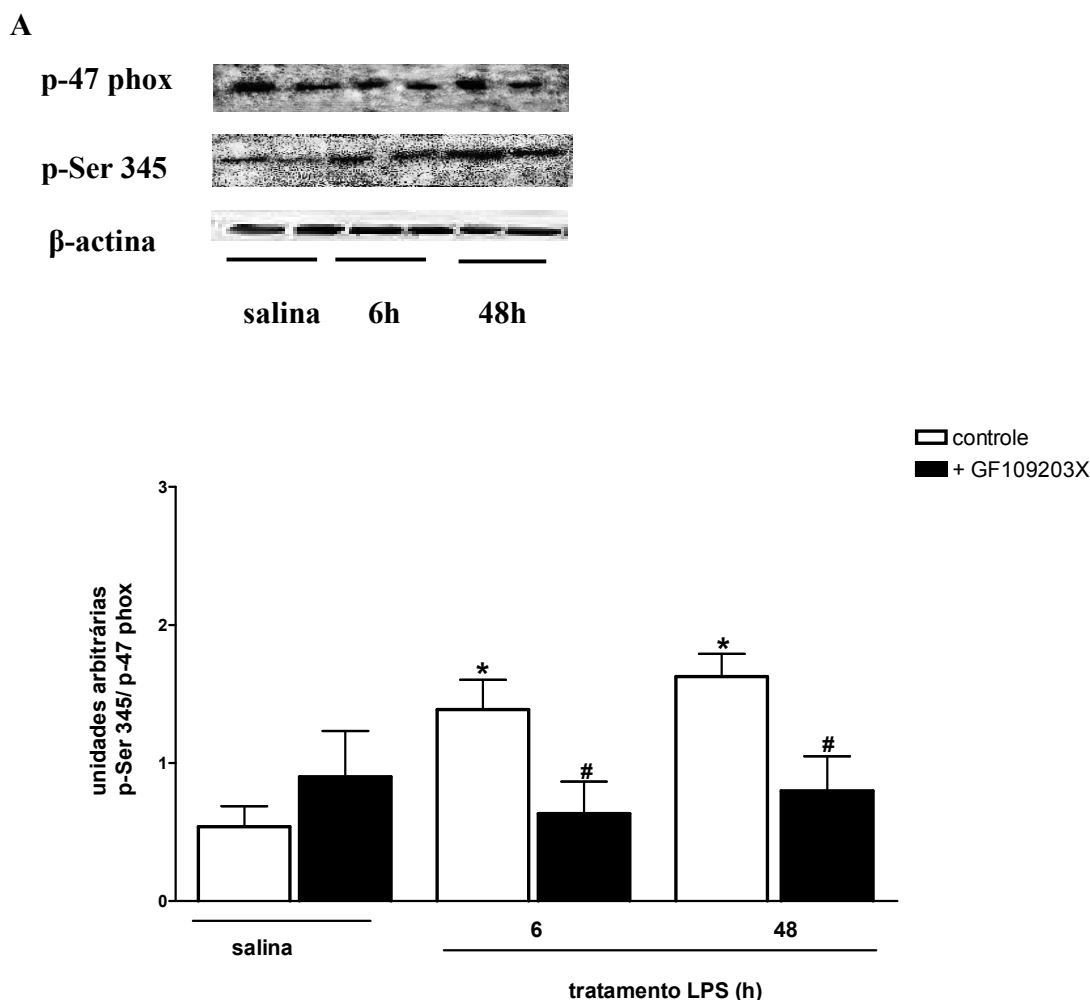


Figura 12: Efeito da inibição da PKC na fosforilação do resíduo Ser 345 da p-47phox de plaquetas de ratos tratados com LPS. Plaquetas de ratos controle e tratados com LPS 6h ou 48h ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram ativadas com ADP ($10\mu\text{M}$), centrifugadas e o precipitado foi congelado até o momento de uso. Em alguns experimentos, a suspensão plaquetária foi incubada com o inibidor de PKC, GF109203X ($10\mu\text{M}$) por 15 min antes do preparo das amostras. Foi realizada a determinação proteica no precipitado plaquetário pelo método de Lowry e $25\mu\text{g}$ de proteína, juntamente com o tampão dissociante, foi adicionado em cada poço para realização da eletroforese. A p-47 phox e a p-Ser 345 foram identificadas por western blotting utilizando o anticorpo primário anti p-47 phox ou p-Ser 345 (diluição 1:2000). O gráfico, na parte inferior da figura, indica o resultado da

densitometria feita das bandas protéicas imunorreativas para p-47phox e p-Ser345 em plaquetas de 4 diferentes animais por grupo. Os resultados são apresentados como valores médios $\pm$ SEM. * $P < 0,05$ comparado com o controle do grupo de ratos injetados com salina. $^{\#}P < 0,05$ comparado com o respectivo controle na ausência de GF109203X.

4.3.2 Efeito da inibição da Src na geração de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS

A incubação de plaquetas com o inibidor inespecífico da Src PP2 (10 μ M), não alterou a liberação de EROs do grupo salina assim como do grupo tratado 48h com LPS. Entretanto, o PP2 diminuiu em 42% a liberação de EROs em plaquetas de ratos 6h após a injeção de LPS (Figura 13)

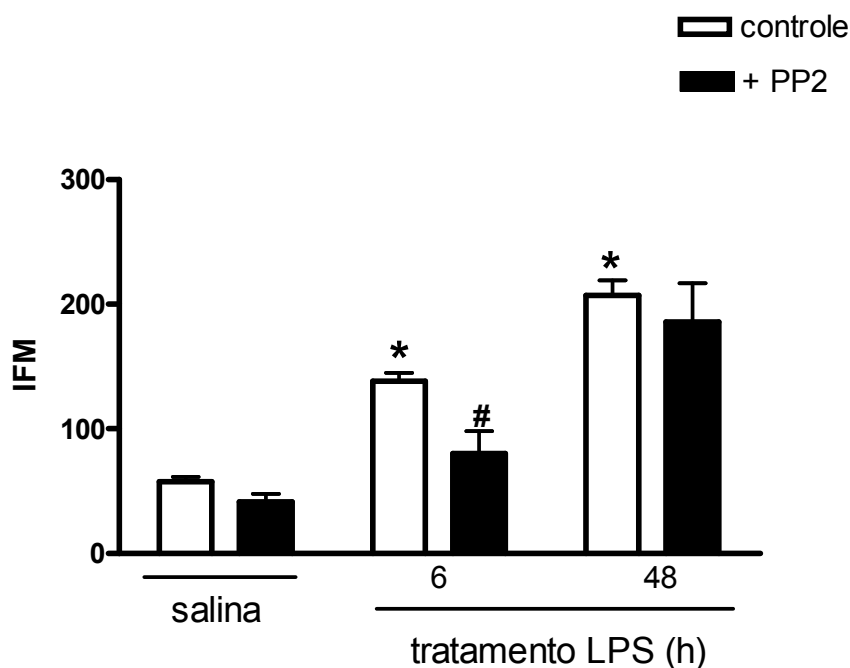


Figura 13: Efeito do inibidor da Src na geração de EROS em plaquetas de ratos tratados com LPS. O sangue dos ratos injetados com salina ou após 6h e 48h da injeção com LPS (1mg /kg) foi coletado. Plaquetas lavadas (1.2×10^8 plaquetas / ml) foram pré-incubadas por 15 min com 10 μ M de PP2 ou com igual volume de DMSO 0.1%. A geração de EROs foi quantificado em plaquetas ativadas com ADP (10 μ M). * $P < 0,05$ comparado com o controle do grupo salina. $^{\#}P < 0,05$ comparado com respectivo controle na ausência de PP2. IFM = índice médio de fluorescência. N=4-6

4.3.3 Efeito da PI3K e da Akt na geração de EROS em plaquetas de ratos tratados com LPS

A figura 14 mostra que a incubação de plaquetas por 15 min com o inibidor da PI3K wortmannin (100nM) ou com inibidor da Akt, API-1 (20 μ M), não alterou a liberação de EROs de plaquetas de animais tratados com salina, assim como dos animais tratados com LPS.

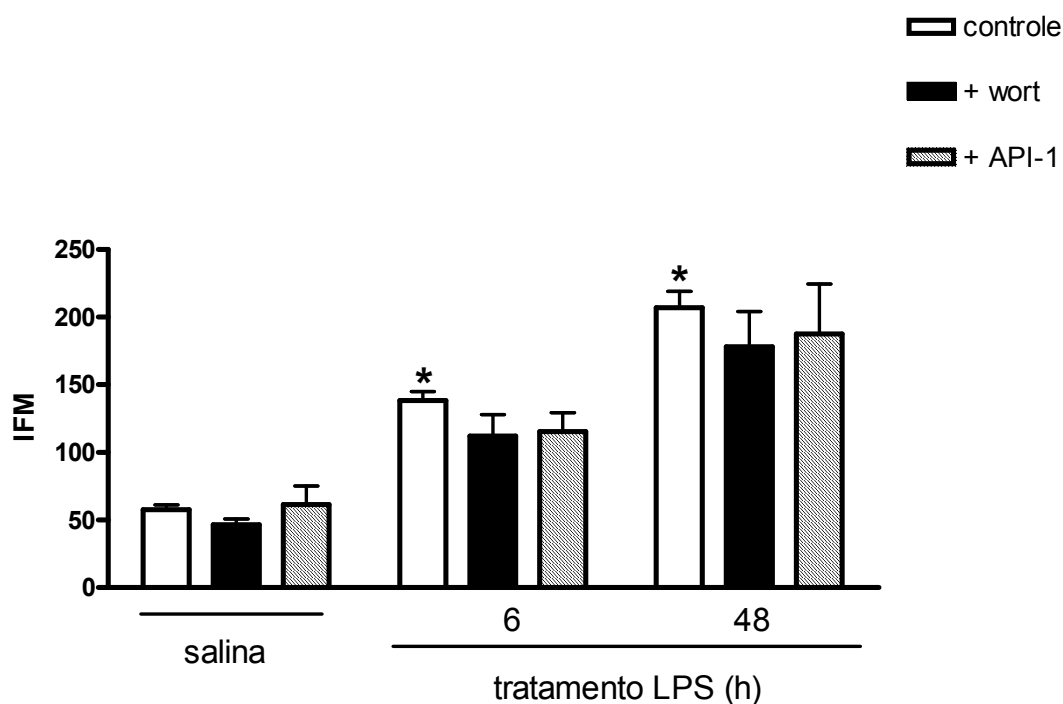


Figura 14: Efeito dos inibidores da PI3K e da Akt na geração de EROS em plaquetas de ratos tratados com LPS. O sangue dos ratos injetados com salina ou após 6h e 48h da injeção com LPS (1mg /kg) foi coletado. Plaquetas lavadas (1.2×10^8 plaquetas / ml) foram pré-incubadas por 15 min de API-1 (20 μ M), wortmannin (100nM) ou com igual volume de DMSO 0.1%. A geração de EROs foi

quantificado em plaquetas ativadas com ADP (10 μ M). * P <0,05 comparado com o controle do grupo salina. IFM = índice de fluorescência média. N=4-6.

4.3.4 Efeito da inibição da guanilil ciclase solúvel e da PKG na geração de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS

A incubação de plaquetas com o inibidor da guanilil cilase ODQ (10 μ M) ou com o inibidor da PKG, Rp-8Br (25 μ M) não alterou a liberação de EROs de plaquetas de animais tratados com salina, assim como dos animais tratados com LPS 6h. Por outro lado, a liberação de EROs em plaquetas de ratos injetados com LPS 48h foi diminuída em 35% e 39% após a incubação com ODQ e Rp-8-Br, respectivamente (figura 15).

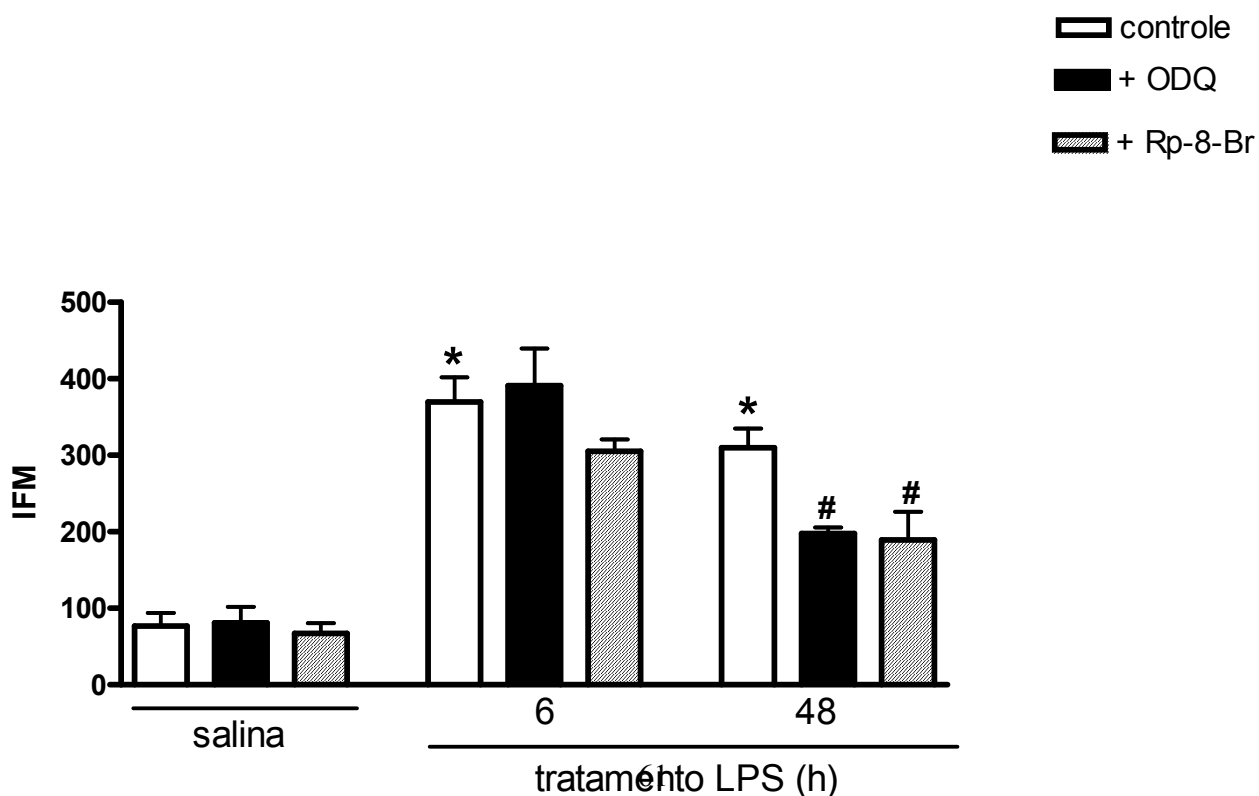


Figura 15: Efeito do inibidor da guanilil ciclase solúvel e da PKG na geração de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS. O sangue dos ratos injetados com salina ou após 6h e 48h da injeção com LPS (1mg /kg) foi coletado. As plaquetas lavadas (1.2×10^8 plaquetas / ml) foram pré-incubadas por 5 min com ODQ (10 μ M), Rp-8Br (5 μ M) ou com mesmo volume de DMSO 0.1%. A geração de EROs foi quantificada em plaquetas ativadas com ADP (10 μ M). *P <0,05 comparado com o controle do grupo salina. #P <0,05 comparado com respectivo controle na ausência dos inibidores enzimáticos. IFM = índice de fluorescência média. N=4-6

5 Discussão

5.1 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA MODULAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DE RATOS TRATADOS COM LPS

A sepse ainda é a causa de muitos óbitos no mundo todo, sendo assim, é importante que vários aspectos desta condição sejam elucidados para a melhoria do seu tratamento. No presente trabalho decidimos investigar as vias de sinalização envolvidas na modulação da reatividade plaquetária, uma vez que trabalhos têm apontado um papel importante das plaquetas na sepse. Para tanto, utilizamos um modelo clássico de sepse experimental, em que ratos foram tratados com uma dose sub-letal de LPS. O aumento de TNF- α plasmático indica que a dose de LPS escolhida foi capaz de induzir um quadro inflamatório no animal, característica deste modelo. Um trabalho prévio do nosso grupo mostrou que esta dose de LPS também causou uma significativa trombocitopenia nos animais, acompanhada de leucopenia em 6h e leucocitose em 48h (Lopes-Pires et al, 2011).

Há poucos trabalhos descrevendo os efeitos do LPS “ex-vivo” em plaquetas e os resultados são bastante controversos. Alguns trabalhos mostram que a administração de LPS inibe a agregação e a adesão plaquetária “*in vitro*” (Cicala et al, 1997; Casarin et al, 2011), enquanto outros mostram ativação desses eventos (Cerwinka et al, 2003; Kutayama et al, 2000). Recentemente, um trabalho de nosso grupo mostrou que o tratamento de ratos com LPS reduziu significativamente a agregação plaquetária, a qual foi independente do aumento da geração intraplaquetária de EROs (Lopes-Pires et al, 2011).

No presente trabalho mostramos que a agregação plaquetária foi reduzida tanto em 6h quanto em 48h após o tratamento com LPS. Estes tempos de observação foram estabelecidos de acordo com

resultados obtidos em nosso laboratório que mostram que em 6h há início de uma redução significativa do número de plaquetas circulantes, bem como da agregação, enquanto em 48h estes parâmetros começam a ser restabelecidos.

Trabalhos mostram que diferentes efeitos causados pelo LPS, tais como aumento da produção de TNF, IL-6 e IL-10 em macrófagos (Leu et al, 2006; Smolinska et al, 2008) e o aumento da expressão de VCAM-1 em células de músculo liso de traquéia humana (Lin et al, 2008) são mediados pela ativação da Src quinase e PI3K. Entretanto, no presente trabalho, os ensaios de western blotting mostraram que a fosforilação de c-Src no resíduo Tyr 416, que indica a ativação da enzima, foi de magnitude semelhante em plaquetas de ratos tratados com salina ou LPS. Além disso, o inibidor inespecífico da Src quinase PP2, não modificou a agregação de ratos tratados com LPS, mas como esperado, inibiu a agregação do grupo controle. Não podemos deixar de citar que plaquetas, além de expressarem a c-Src, também expressam outras enzimas da família Src como a Fyn e a Lyn que inibem a ativação plaquetária por reduzirem a mobilização intracelular de Ca^{+2} e a ativação da PKC e do receptor de fibrinogênio (Maxwell et al, 2004; Kim e Kunapuli, 2011). Portanto nossos resultados indicam que as quinases da família Src não estão envolvidas no efeito inibitório do LPS na agregação plaquetária quer em 6h ou 48h.

O LPS induz a geração de EROs e ERNs em diferentes células. Dentre as ERNs podemos citar o NO e o peroxinitrito (ONOO^-) que é formado pela reação entre NO e O_2^- (McCuskey et al, 1996; Zhang et al, 2001; Shimizu et al, 2012; Yu et al, 2012). Nossos resultados mostram que há um aumento dos níveis de GMPc, bem como da nitração, em plaquetas de ratos tratados com LPS em comparação com o grupo controle, indicando um aumento da síntese de NO e ONOO^- , uma vez que a nitração é considerada um marcador para a produção do último.

Está bem estabelecido que o NO inibe a ativação plaquetária por mecanismos dependentes de GMPc, principalmente através da ativação da PKG e por mecanismos independentes deste nucleotídeo, envolvendo a produção de ONOO^- (Cavallini et al, 1996; Marcondes et al, 2006). O efeito de ONOO^- em plaquetas ainda é pouco compreendido uma vez que este radical pode tanto ativar (Moro et al, 1994; Brown et al, 1998) como inibir sua atividade (MacMillan-Crow et al, 1996; Marcondes et al, 2006, Cardoso et al, 2010). Alguns trabalhos mostram que o ONOO^- pode induzir agregação plaquetária, bem como aumentar a expressão de P-selectina, a concentração intracelular de Ca^{+2} e a atividade da ciclooxigenase-1 (Redondo et al, 2005; Brown et al, 1998; Moro et al, 1994; Schildknecht et al, 2008). Por outro lado, o ONOO^- pode inibir a ativação plaquetária através da

fosforilação da VASP (vasodilatador-stimulated phosphoprotein) via ativação da PKC ou através da nitração de diferentes proteínas como a ciclooxigenase (COX) e a α -actinina (Bouloset al, 2000; Marcondes et al, 2006). A incubação de plaquetas com o sequestrador de ONOO^- ECG mostra que a inibição da agregação observada 48h após o tratamento com LPS é parcialmente dependente desta espécie. Por outro lado, a inibição da agregação 6h após o tratamento com LPS é independente da formação de ONOO^- , apesar da nitração ser semelhante à observada em 48h. Trabalhos mostram que a nitração de um único resíduo de tirosina pode levar a modificação da função de uma determinada proteína (Souza et al, 2008), o que poderia justificar as discrepâncias nos nossos resultados observados em 6h e 48h, já que os ensaios de western blotting não nos permite este tipo de análise.

Como já comentado anteriormente, o NO pode inibir a ativação plaquetária através da ativação da guanilil ciclase (sGC) com consequente aumento da produção de GMPc, que por sua vez leva à ativação da PKG. A ativação da PKG pode inibir a ativação plaquetária por diferentes mecanismos como a fosforilação do receptor de IP_3 no sistema tubular denso, levando à diminuição da liberação de Ca^{+2} , inibição da entrada de Ca^{+2} extracelular, redução da ativação do receptor de fibrinogênio e da polimerização da actina (Geiseret al, 1994; Horstrup et al, 1994; Cavallini et al, 1996; Butt et al, 2001). Nossos resultados mostram que a incubação de plaquetas com o inibidor da sGC ODQ ou com o inibidor de PKG Rp-8-Br preveniu a inibição da agregação observada em 6h após a injeção de LPS, indicando que este efeito é mediado pelo aumento de GMPc e ativação de PKG. Entretanto, o efeito inibitório do LPS em 48h na agregação não é mediado pelo aumento de GMPc ou ativação da PKG, mesmo na presença de níveis aumentados deste nucleotídeo. Estes resultados em conjunto indicam que, em 48h, o ONOO^- seja o determinante da inibição da agregação em detrimento do aumento de GMPc.

Até o momento, nossos resultados indicam que há um aumento da síntese de NO em plaquetas de ratos tratados com LPS, seja devido ao aumento de GMPc intraplaquetário, seja pelo aumento da nitração. Portanto, resolvemos estudar as vias de sinalização envolvidas na modulação da produção de NO em plaquetas de ratos tratados com LPS.

O NO é sintetizado pela enzima NO sintase (NOS) que pode ser do tipo neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) ou induzível (iNOS). A eNOS não é restrita à célula endotelial, mas também pode ser observada em várias células e tecidos como no cérebro, pulmão, rim, trato gastrointestinal, órgãos reprodutivos, megacariócitos e plaquetas. A atividade da eNOS pode ser modulada por processos pós-translacionais como interação com outras proteínas e múltiplas fosforilações (Dudzinski e Michel,

2007). A fosforilação nos resíduos Ser 1177, Ser 635 e Ser 617 estimula a atividade enzimática da eNOS, enquanto a fosforilação nos resíduos Thr 495 e Ser 116 é inibitória (Bauer et al, 2003).

Trabalhos mostram que quinases como Akt, PKA (proteína quinase A) ou AMPK (proteína quinase ativada por AMP) fosforilam o resíduo Ser1179 da eNOS, promovendo a ativação da enzima (Monti et al, 2009). De modo geral, a PKC tem sido descrita como inibidora da eNOS (Michell et al, 2011; Dudzinski e Michell, 2007), mas recentemente Signorello e colaboradores (2011) demonstraram que a PKC ativa a eNOS, via fosforilação da Ser 1177, em plaquetas estimuladas com o endocanabinóide 2-araquidonilglicerol.

A família da PKC quinase é composta por 10 membros, sendo que a localização intracelular, a expressão e a ativação de cada isoforma é dinamicamente modulada por diferentes enzimas e condições, como no estresse oxidativo, onde há ativação da δ PKC e estimulação da ϵ PKC (Nakano et al, 2000; Bright et al, 2007).

No presente trabalho, nós mostramos que a incubação de GF109203X com plaquetas de ratos injetados com salina aumentou os níveis de GMPc, o qual foi acompanhado pela inibição da agregação, indicando que a eNOS foi modulada negativamente pela PKC em ratos saudáveis. Por outro lado, em ratos injetados com LPS em 6h, o GF109203X reduziu os níveis aumentados de GMPc em plaquetas e aumentou a agregação. Recentemente, Monti e colaboradores (2010) mostraram um aumento da ativação da δ PKC em células endoteliais coronarianas em condição de estresse oxidativo induzido pela redução de soro no meio, a qual foi acompanhada pela ativação da eNOS via fosforilação da Ser1179. Ao mesmo tempo, estes autores observaram diminuição da ativação da ϵ PKC e a redução da fosforilação dos resíduos Thr 497 e Ser 116. Portanto, é possível especular que o tratamento de ratos com LPS em 6h, momento no qual se inicia o estresse oxidativo como reportado por Lopes-Pires e colaboradores (2011), leva ativação de uma diferente isoforma de PKC do que a observada em plaquetas de ratos saudáveis, com consequente ativação de eNOS, aumento de GMPc e inibição da agregação plaquetária. Já a inibição da PKC em plaquetas de ratos 48h após a injeção de LPS, assim como ocorreu em plaquetas de ratos controle, levou ao aumento dos níveis de GMPc. Com já comentado anteriormente, em 48h após a administração do LPS inicia-se o restabelecimento da atividade plaquetária, sendo praticamente normalizada em 72h. Uma vez que não usamos um inibidor específico para as diferentes isoformas de PKC, poderíamos especular que neste período (48h) estariam sendo ativados mecanismos protetores como a ativação da ϵ PKC, que levaria a inibição da eNOS na tentativa de diminuir o estresse oxidativo nestas células. Como esperado, a

inibição da PKC não modificou a agregação plaquetária 48h após a administração de LPS, já que neste momento o efeito inibitório do LPS é independente de GMPc.

Alguns trabalhos reportam que a PI3K e a AKT também podem mediar alguns efeitos induzidos pelo LPS como lesões em células cardíacas ou o aumento de aldosterona pelas adrenais (Liu et al, 2010; Huang et al, 2010).

Em plaquetas, a PI3K está envolvida na estabilização do citoesqueleto contribuindo com a mudança de forma plaquetária (Morello et al, 2008). Quando incubamos as plaquetas com o inibidor da PI3K wortmannin verificamos que a agregação de ratos injetados com LPS em 6h não foi alterada, mas tanto o grupo salina quanto o grupo injetado 48h com LPS tiveram a agregação significativamente diminuída, o que nos faz concluir que a PI3K contribui para formação do agregado plaquetário em ratos saudáveis e na fase tardia da sepse.

Está bem estabelecido que a AKT pode ser ativada pela PI3K através da fosforilação dos resíduos Thr 308 e Ser 473 (Burgering and Coffey, 1995; Kroner et al, 2000). Nossos resultados mostraram, através da análise do western blotting para fosfo-Thr 318-AKT, um aumento na ativação de AKT em plaquetas de ratos tratados com LPS comparado aos ratos controle. Resultado semelhante foi reportado por Schabbauer e colaboradores (2009), que demonstraram que a atividade da AKT em células sanguíneas de ratos e camundongos tratados com LPS (5 mg/kg) por 1h foi significativamente aumentada quando comparada aos animais controle. De modo geral, a AKT está envolvida na ativação plaquetária induzida por alguns agonistas como a trombina (Reséndiz et al, 2007). Entretanto, no presente trabalho, a inibição da AKT pelo API-1 preveniu a inibição da agregação de plaquetas de ratos 6h após a injeção do LPS, apesar da mesma não ter sido modificada pelo wortmannin. De fato, há trabalhos que mostram que a AKT pode ser ativada por outras enzimas além da PI3K, como a PKC (Kroner et al, 2000) e por quinases dependentes de Ca^{+2} /calmodulina (Yono et al, 1998). Está bem estabelecido que a AKT pode ativar a eNOS principalmente pela fosforilação do resíduo de Ser 1177 (Dudzinski and Michel, 2007). Portanto, no presente trabalho podemos especular que o tratamento de ratos com LPS em 6h aumenta a ativação da AKT em plaquetas, via mecanismos independentes da PI3K, levando a ativação da eNOS com conseqüente aumento dos níveis de GMPc e inibição da agregação plaquetária. É interessante notar que em 48h após a injeção de LPS, as plaquetas apresentaram um aumento da ativação da AKT, mas o API-1 não modificou a agregação plaquetária. Portanto, estes resultados corroboram a idéia que a AKT esteja envolvida no aumento de GMPc nas

plaquetas tratados com LPS, uma vez que a inibição da agregação plaquetária 48h após a administração de LPS é independente deste nucleotídeo.

5.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) EM PLAQUETAS DE RATOS TRATADOS COM LPS

Trabalho prévio do nosso grupo mostrou que em plaquetas de ratos tratados com LPS ocorre uma formação significativamente aumentada de EROs, principalmente através da ativação da NADPH oxidase (Lopes-Pires et al, 2011).

A NADPH oxidase de fagócitos ou da NOX-2 é constituída por duas subunidades na membrana citoplasmática, a gp91phox e a p22phox, que juntas formam o flavocitocromo b₅₅₈ e três subunidades citosólicas- a p47phox, p67phox, p40phox, além da trifosfatase da guanosina (GTPase) (Gianni et al, 2008; Bäumer et al, 2008). A ativação da enzima envolve a fosforilação e a translocação dos componentes citosólicos para o flavocitocromo b₅₅₈, na membrana. (Bokock, 1994). Em neutrófilos ativados, a p47phox é fosforilada em vários resíduos de serina, incluindo Ser303/304, Ser315, Ser320, Ser328 e/ou Ser359/370, e Ser345/348 (El Benna et al, 1994; El Benna et al, 1996).

A primeira evidência da expressão da NADPH oxidase em plaquetas foi mostrada por Blache e colaboradores em 1995, que detectaram as subunidades p22phox e p67phox em plaquetas lisadas. Mais tarde foram encontradas as subunidades gp91phox e p47phox (Pignatelli et al, 2004).

Nossos resultados mostram que há um aumento da fosforilação da p47phox em plaquetas de ratos tratados com LPS, o que contribui para ativação da NADPH oxidase e aumento da geração de EROs. De fato, há estudos mostrando que o LPS ativa a NADPH oxidase e, portanto, leva a um aumento da formação de O₂⁻ (Whitworth et al, 1989; Nystrom et al, 1994). Li e Frei (2009) demonstraram que a incubação de células endoteliais de aorta humana com LPS por 24h aumenta a atividade da NADPH oxidase e também a expressão da subunidade p22phox.

Diversos estudos demonstraram a participação da PKC na ativação da NADPH oxidase. O inibidor da PKC diminui a expressão e a translocação das subunidades da NADPH oxidase em células apoptóticas (Deng et al, 2012). Em plaquetas, Pignateli e colaboradores (2006) mostraram que os polifenóis quercitina e catequina inibem a ativação da NADPH oxidase via inibição da PKC. Neste trabalho mostramos que a fosforilação da p47phox é reduzida pela inibição da PKC, bem como a geração de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS, indicando um papel importante desta enzima no estresse oxidativo em plaquetas observado neste quadro.

A Src quinase tem sido descrita como uma importante enzima envolvida na modulação da ativação da NADPH oxidase em diferentes modelos através da fosforilação de resíduos de tirosina principalmente da p47-phox. Foi demonstrado que a angiotensina II induz um aumento da produção de O_2^- em células de músculo liso vascular através da fosforilação da p47phox pela Src quinase, com consequente ativação da NADPH oxidase (Touyz et al, 2003). Nossos resultados mostraram que a incubação de plaquetas de ratos 6h após a administração de LPS com PP2 reduziu significativamente a geração de EROs, indicando um papel importante da Src neste efeito. Corroborando os nossos resultados, Chowdhury e colaboradores (2005) mostraram que células endoteliais de artéria pulmonar humana, em condição de estresse oxidativo induzido por hipóxia, apresentaram uma geração de EROs aumentada via fosforilação da p47phox pela Src. Por outro lado, a Src parece não desempenhar qualquer efeito modulatório na liberação de EROs em plaquetas de ratos injetados com salina ou LPS em 48h.

Outra enzima importante na modulação da atividade enzimática da NADPH oxidase é a PI3K (Nisimoto et al, 1999; Clutton et al, 2004). Apesar de alguns trabalhos reportarem que a PI3K aumenta a produção de EROs em plaquetas de ratos e humanas via ativação da NADPH oxidase (Clutton et al., 2004; Bäumer et al, 2008), nossos resultados mostraram que a incubação de plaquetas de ratos injetados com salina ou LPS com o inibidor de PI3K não modificou a liberação destas espécies.

Tendo em vista que foi observado um aumento da ativação da AKT em plaquetas de ratos tratados com LPS, nós decidimos investigar a participação da AKT no aumento da formação de EROs nestas células. Além disso, vários autores mostram que a AKT pode levar a um aumento da atividade da NADPH oxidase (Hoyal et al, 2003, Park et al, 2010, Edderkaoui et al, 2011, Chatterjee et al, 2012). Já foi mostrado que a AKT aumenta a expressão da subunidade p22phox da NADPH oxidase (Edderkaoui et al, 2011) e aumenta a fosforilação da p47phox (Hoyal et al, 2003). Entretanto, no presente trabalho, a incubação das plaquetas com o inibidor de AKT não modificou a geração de EROs tanto 6h quanto 48h após a administração de LPS.

Já foi descrito que a via NO-GMPc-PKG pode participar da ativação da NADPH oxidase. A estimulação de receptores NMDA de neurônios de camundongos em cultura levou a um aumento da produção de EROs mediado por NADPH oxidase a qual foi estimulada pela via NO-GMPc-PKG (Girouard et al., 2009). A incubação com inibidor da GCs ou com inibidor da PKG diminuiu a liberação de EROs em plaquetas de ratos 48h após a injeção de LPS, mas não em 6h, apesar dos

níveis deste nucleotídeo estarem aumentados em ambos períodos. Dessa forma, nossos resultados mostram que a via NO/GMPc/PKG modula a geração de EROs em plaquetas somente na fase tardia da sepse induzida por LPS.

6 Conclusões

- As vias de sinalização envolvidas na modulação da agregação plaquetária e liberação de EROs em plaquetas é dependente do tempo de exposição do animal ao LPS;
- A inibição da agregação plaquetária observada 6h após a injeção de LPS (fase inicial) é mediada pela via NO/GMPc/PKG e também é modulada pela PKC e AKT;

- O peroxinitrito tem papel importante na inibição da agregação plaquetária somente na fase tardia (48h) da sepse experimental;

- A PKC está envolvida na ativação da NADPH oxidase e, conseqüentemente no aumento da formação de EROs, em plaquetas de ratos 6h e 48h após a injeção de LPS;

- A Src e a via de sinalização NO/GMPc/PKG juntamente com a PKC modulam a liberação de EROs em plaquetas na fase inicial e tardia da sepse, respectivamente.

7 Referências Bibliográficas

- Aebi H . Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121-6

- Akerboom TP, Sies H . Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981;77:373-82.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 1996;15(23):6541-51.
- Amura CR, Kamei T, Ito N, Soares MJ, Morrison DC. Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins. *J. Immunol.* 1998; 161(5):2552-60.
- Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KVJ, Pate KD, Kubes P. Platelets Express functional Toll-like receptor-4. *Blood.* 2005; 106(7): 2417-23.
- Araújo CA, Vasconcelos DO, Cavalcanti DC, Silva FML, Souza W, Coutinho MH. Fator Inibidor de Macrófagos e Septicemia. *Rev. Port. Imunoalergologia.* 2005; 13(1): 19-23.
- Atkinson, B.T., Stafford, M.J., Pears, C.J. and Watson, S.P. Signalling events underlying platelet aggregation induced by the glycoprotein VI agonist convulxin. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268, 5242–5248
- Barragán M, de Frias M, Iglesias-Serret D, Campàs C, Castaño E, Santidrián AF, Coll-Mulet L, Cosialls AM, Domingo A, Pons G, Gil J. Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C β . *J Leukoc Biol.* 2006; 80(6):1473-9.
- Barry FA, Gibbins JM. Protein kinase B is regulated in platelets by the collagen receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem.* 2002; 277(15):12874-8.
- 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. *J Biol Chem.* 2008; 283(12):7864-76

- Begonja AJ, Gambaryan S, Geiger J, Aktas B, Pozgajova M, Nieswandt B, Walter U. Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS production regulates alphaIIbeta3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. *Blood.* 2005; 106(8): 2757-60.

- Belisario MA, Tafuri S, Di Domenico C, Squillacioti C, Della Morte R, Lucisano A, Staiano N. H(2)O(2) activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1495(2):183-93.

- Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM. Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation.* 2002;105(3):293-6.

- Ben-Shaul V, Lomnitski L, Nyska A, Zurovsky Y, Bergman M, Grossman S. The effect of natural antioxidants, NAO and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. *Toxicol Lett.* 2001;123(1):1-10.

- Bergenti L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 1999; 65(18-19): 1865-74.

- Beutler E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. Grune & Stratton. New York, 1984.

- 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.

- Bian K, Murad F. Nitric oxide (NO): biogenesis, regulation and relevance to human diseases. *Front. Biosci.* 2003; 8:d264-78

- Bochud PY, Calantra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *Clin. Rev.* 2003; 326(7383):262-66.
- Bokock GM. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1994; 6(2): 212-18
- Boulos C, Jiang H, Balazy M. Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Apr;293(1):222-9.
- Bowen R, Haslam RJ. Effects of nitrovasodilators on platelet cyclic nucleotide levels in rabbit blood; role for cyclic AMP in synergistic inhibition of platelet function by SIN-1 and prostaglandin E1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;17:424–433.
- Boylan B, Gao C, Rathore V, Gill JC, Newman DK, Newman PJ. Identification of FcγRIIa as the ITAM-bearing receptor mediating αIIbβ3 outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood* . 2008; 112:2780–2786.
- Brandtzaeg P. Significance and pathogenesis of septic shock. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 216:15-37.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci.* 1989; 86(22):9030-33.
- Brown, M.T. & Cooper, J.A. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996; 1287:121-210.
- Buensuceso, C.S., Obergfell, A., Soriani, A., Eto, K., Kiosses, W.B., Arias-Salgado, E.G., Kawakami, T. and Shattil, S.J. Regulation of outside-in signaling in platelets by integrin-associated protein kinase C beta. *J. Biol. Chem.* 2005; 280, 644–653.
- Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature.* 1995;376(6541):599-602.

- Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*. 1997; 6(4): 391-97.
- Caenepeel S, Charyszak G, Sudarsanam S, Hunter T. The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101:11707-11712.
- Cardoso MH, Morganti RP, Lilla S, Murad F, De Nucci G, Antunes E, Marcondes S. The role of superoxide anion in the inhibitory effect of SIN-1 in thrombin-activated human platelet adhesion. *Eur J Pharmacol*. 2010; 627: 229-234
- 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 to fibrinogen. *Life Sci*. 2011;89 (21-22):773-8
- Cathcart MK. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jan;24(1):23-8.
- Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem*. 1996; 271(10):5545-51.
- Cerwinka WH, Cooper D, Kriegstein CF, Feelisch M, Granger DN. Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venule. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2002; 282(3):H1111-17.
- Cerwinka WH, Cooper D, Kriegstein CF, Ross CR, McCord JM, Granger DN. Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol*. 2003; 284(2):H535-41.

- Cesbron JY, Capron A, Vargaftig BB, Lagarde M, Pincemail J, Braquet P, Taelman H, Joseph M. Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature*. 1987; 325 (6104): 533-36.
- Chatterjee S, Browning EA, Hong N, Debolt K, Sorokina EM, Liu W, Birnbaum MJ, Fisher AB. Membrane depolarization is the trigger for PI3K/Akt activation and leads to the generation of ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Jan;302(1):H105-14.
- Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996 Jan;27(1):154-8.
- Cho MJ, Pestina TI, Steward SA, Lowell CA, Jackson CW, Gartner TK. Blood. Role of the Src family kinase Lyn in TxA₂ production, adenosine diphosphate secretion, Akt phosphorylation, and irreversible aggregation in platelets stimulated with gamma-thrombin. 2002;99(7):2442-7.
- Chowdhury AK, Watkins T, Parinandi NL, Saatian B, Kleinberg ME, Usatyuk PV, Natarajan V. Src-mediated tyrosine phosphorylation of p47phox in hyperoxia-induced activation of NADPH oxidase and generation of reactive oxygen species in lung endothelial cells. *J Biol Chem*. 2005; 280(21):20700-11.
- Cicala C, Santacrose C, Itoh H, Douglas GJ, Page CP. A study on rat platelet responsiveness following intravenous endotoxin administration. *Life Sci* 1997;60:PL31-PL38
- Clark EA, Brugge JS. Redistribution of activated pp60c-src to integrin-dependent cytoskeletal complexes in thrombin-stimulated platelets. *Mol. Cell. Biol*. 1993; 13:1863-1871.
- Clutton P, Miermont A, Freedman JE. Regulation of endogenous reactive oxygen species in platelets can reverse aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24(1):187-92.
- Cooper, JA, King CS. Dephosphorylation of antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60c-src. *Mol. Cell. Biol*. 1998; 6:4467-4477.

- Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):2033-43. Epub 2006 Jun 15.
- Datasus. Departamento de Informação e Informática do SUS [on-line] 2006 [Acesso 3jun 2007]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def>.
- Dekker LV, Leitges M, Altschuler G, Mistry N, McDermott A, Roes J, Segal AW. Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem J.* 2000 Apr 1;347 Pt 1:285-9.
- Deng B, Xie S, Wang J, Xia Z, Nie R. Inhibition of protein kinase C $\beta(2)$ prevents tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and oxidative stress in endothelial cells: the role of NADPH oxidase subunits. *Deng B, Xie S, Wang J, Xia Z, Nie R. J Vasc Res.* 2012;49(2):144-59. doi: 10.1159/000332337.
- Dikalov SI, Li W, Doughan AK, Blanco RR, Zafari AM. Mitochondrial reactive oxygen species and calcium uptake regulate activation of phagocytic NADPH oxidase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012;302(10):R1134-42.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation *Nature.* 1999;399(6736):601-5.
- Ding J, Vlahos CJ, Liu R, Brown RF, Badwey JA. Antagonists of phosphatidylinositol 3-kinase block activation of several novel protein kinases in neutrophils. *J Biol Chem.* 1995 May 12;270(19):11684-91.

- Dong HP, Chen HW, Hsu C, Chiu HY, Lin LC, Yang RC. Previous heat shock treatment attenuates lipopolysaccharide-induced hyporesponsiveness of platelets in rats. *Shock*. 2005 Sep;24(3):239-44.
- Drake J, Kanski J, Varadarajan S, Tsoras M, Butterfield DA. Elevation of brain glutathione by γ -glutamylcysteine ethyl ester protects against peroxynitrite-induced oxidative stress. *J. Neurosci. Res.* 2002; 68(6): 776-84.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82(1): 47-95.
- Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res.* 2007; 75(2):247-60.
- Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2003; 39 (4): 343-50.
- Edderkaoui M, Nitsche C, Zheng L, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. NADPH oxidase activation in pancreatic cancer cells is mediated through Akt-dependent up-regulation of p22phox. *J Biol Chem.* 2011;286(10):7779-87.
- El Benna J, Faust LP, Babior BM. The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem.* 1994;269(38):23431-6.
- El Benna J, Faust RP, Johnson JL, Babior BM. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1996;271(11):6374-8.

- El Benna J, Hayem G, Dang PM, Fay M, Chollet-Martin S, Elbim C, Meyer O, Gougerot-Pocidalo MA. NADPH oxidase priming and p47phox phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy. *Inflammation*. 2002; 26(6):273-8.
- El Benna J, Hayem G, Dang PM, Fay M, Chollet-Martin S, Elbim C, Meyer O, Gougerot-Pocidalo MA. NADPH oxidase priming and p47phox phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy. *Inflammation*. 2002;26(6):273-8.
- Falet, H., Ramos-Morales, F., Bachelot, C., Fischer, S. & Rendo, F. Association of the protein tyrosine phosphatase PTP1C with the protein tyrosin kinase c-Src in human platelets. *FEBS Lett*. 1996; 383:165-169.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1997; 43 (1): 1-16.
- Fleming I, Busse R. The physiology of nitric oxide: control and consequences. *Curr Med Chem*, 2004, 3, 189-205.
- Flohé L, Gunzeler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol*. 1984; v. 105, p. 114-121.
- Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HHH, Heller M, Murad, F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1991; 88(5): 1788-92.
- Frame, M.C. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta*. 2002; 1602:114-130.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev*. 2010, 62: 525-63.
- Freedman JE. Oxidative Stress and Platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008; 28(3): s11-s16.

- Galley HF, Davies MJ, Webster NR. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. *Crit. Care Med.* 1996; 24(10):1649-53.
- Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, Presnell SR, Figeys D, Harrison DG, Berk BC, Aebersold R, Corson MA. Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *J Biol Chem.* 1999 Oct 15;274(42):30101-8.
- Gambaryan S, Kobsar A, Hartmann S, Birschmann I, Kuhlencordt PJ, Müller-Esterl W, Lahmann SM, Walter U. NO-synthase-NO-independent regulation of human and murine platelet soluble guanylyl cyclase activity. *J Thromb Haemost.* 2008; 6 (8): 1373-75.
- Gao XP, Standiford TJ, Rahman A, Newstead M, Holland SM, Dinanuer MC, Liu QH, Malik AB. Role of NADPH oxidase in the mechanism of lung neutrophil sequestration and microvessel injury induced by Gram-negative sepsis: studies in p47phox^{-/-} and gp91phox^{-/-} mice. *J Immunol.* 2002;168(8):3974-82.
- Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 1997; 23(4): 379-85.
- Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005; 26(4): 190-95.
- 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. *Mol Biol Cell.* 2008; 19(7): 2984–2994
- Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. *Circ Res.* 2007;101(7):654-62.

- Gong P, Angelini DJ, Yang S, Xia G, Cross AS, Mann D, Bannerman DD., Vogel SN, Goldblum SE. TLR4 signaling is coupled to SRC family kinase activation, tyrosine phosphorylation of zonula adherens proteins, and opening of the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *J. Biol. Chem.* 2008; 283:13437-13449.
- Gresele, P., Page, C., Fuster, V. and Vermynen, J. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics. 2002; Cambridge University Press.
- Haimovich, B., Kaneshiki, N. and Ji, P. Protein kinase C regulates tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets adherent to fibrinogen. *Blood.* 1996; 87, 152–161.
- Handin RI, Karabin R, Boxer GJ.. Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest.* 1977;59(5):959-65
- Heuman D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta.* 2002; 323(1-2): 59-72.
- Hirsch E, Bosco O, Tropel P, Laffargue M, Calvez R, Altruda F, Wymann M, Montrucchio G. Resistance to thromboembolism in PI3Kgamma-deficient mice. *FASEB J.* 2001 Sep;15(11):2019-21. Epub 2001 Jul 9.
- Hordijk PL. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res.* 2006;3;98(4):453-62.
- Hoyal CR, Gutierrez A, Young BM, Catz SD, Lin JH, Tschlis PN, Babior BM. Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(9):5130-5.
- Huang HL, Chiang MF, Lin CW, Pu HF. Lipopolysaccharide directly stimulates aldosterone production via toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 related PI(3)K/Akt pathway in rat adrenal zona glomerulosa cells. *J Cell Biochem.* 2010;111(4):872-80.

- Huet O, Obata R, Aubron C, Spraul-Davit A, Charpentier J, Laplace C, Nguyen-Khoa T, Conti M, Vicaute E, Mira JP, Duranteau J. Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock. *Crit Care Med.* 2007;35(3):821-6.
- Ibeagha-Awemu EM, Lee J, Ibeagha AE, Zhao X. Bovine CD14 characterization and relationship between polymorphisms and surface expression on monocytes and polymorphonuclear neutrophils. *BMC Genetics.* 2008; 9: 50.
- Ichinohe T, Takayama H, Ezumi Y, Yanagi S, Yamamura H, Okuma M. Cyclic AMP-insensitive activation of c-Src and Syk protein-tyrosine kinases through platelet membrane glycoprotein VI. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:28029-28036.
- Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1985;25:171-91.
- Imgenex. Imgenex Corp. [on-line] [Acesso em 2 jun 2009]. Disponível em: <http://www.imgenex.com/Toll-likeReceptors.php>.
- Jackson SP, Schoenwaelder SM, Goncalves I, Nesbitt WS, Yap CL, Wright CE, Kenche V, Anderson KE, Dopheide SM, Yuan Y, Sturgeon SA, Prabakaran H, Thompson PE, Smith GD, Shepherd PR, Daniele N, Kulkarni S, Abbott B, Saylik D, Jones C, Lu L, Giuliano S, Hughan SC, Angus JA, Robertson AD, Salem HH. PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med.* 2005 May;11(5):507-14. Epub 2005 Apr 17.
- Jayachandran M, Brunn JG, Karnicki K, Miller RS, Owen WG, Miller VM. In vivo effect of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk. *J. Appl. Physiol.* 2007; 102(1): 429.
- Jean-Baptiste E. Cellular Mechanisms in Sepsis. *Journal Intensive Care Medicine.* 2007; 22(2): 63-72.

- Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev.* 2011;63(1):218-42.
- Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. 1991. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 15;88(10):4171-5.
- Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol. Med. Today.* 1999; 5(3):123-32.
- Keen RR, Stella L, Flanigan DP, Lands WE. Differential detection of plasma hydroperoxides in sepsis. *Crit. Care Med.* 1991; 19(9):1114-19.
- Khadour FH, Panas D, Ferdinandy P, Schulze C, Csont T, Lalu MM, Wildhirt SM, Schulz R. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(3):H1108-15.
- Kim S, Kunapuli SP. Negative regulation of Gq-mediated pathways in platelets by G(12/13) pathways through Fyn kinase. *J Biol Chem.* 2011;286(27):24170-9
- Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G, Offermanns S (1999) Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol* 144:745–754
- Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem.* 2000; 267(16):4928-44.
- Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, Gorąca A. The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012;60(4):277-94.

- Kovacic P, Pozzos 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. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12(22): 2601-23.
- Kox M, Wijetunge S, Pickkers P, Hughes AD. Inhibition of Src family tyrosine kinases prevents lipopolysaccharide-induced hyporeactivity in isolated rat tail arteries. *Vascul. Pharmacol.* 2006;46:195-200.
- Krause KH. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Exp Gerontol.* 2007; 42 (4): 256-62.
- Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood* 1996; 88:1525-41.
- Kroner C, Eybrechts K, Akkerman JW. Dual regulation of platelet protein kinase B. *J Biol Chem.* 2000; 275(36):27790-8.
- 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.* 2002; 100(3): 917-24.
- Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(11):1988-96.
- Katayama T, Ikeda Y, Handa M, Tamatani T, Sakamoto S, Ito M, Ishimura Y, Suematsu M. Immunoneutralization of glycoprotein Iba α attenuates endotoxin-induced interactions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo. *Circ Res* 2000;86:1031-1037
- Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, Ministri-Madrid K, Killeen N, Phillips DR (1999a) Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in α IIb β 3 signalling and platelet function. *Nature* 401:808–811

- Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Ministri K et al (1999b) Genetic and pharmacological analyses of Syk function in α IIb β 3 signaling in platelets. *Blood* 93:2645–2652
- Lehninger AL, Nelson DL, COX MM. Lehninger princípios da bioquímica. In: Lehninger AL. 3º ed. São Paulo. Sarvier, 2000: 973.
- Leu TH, Charoenfuprasert S, Yen CK, Fan CW, Maa MC. Lipopolysaccharide-induced c-Src expression plays a role in nitric oxide and TNF- α secretion in macrophages. *Mol. Immunol.* 2006; 43:308-316.
- Li CJ, Elsasser TH, Kahl S. AKT/eNOS signaling module functions as a potential feedback loop in the growth hormonesignaling pathway. *J Mol Signal.* 2009 Mar 25;4:1.
- Li Z, Zhang G, Feil R, Han J, Du X. Seqüencial activation of p38 and ERK pathways by CGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin α IIb β 3. *Blood* 2006; 107:965-972.
- Liebenhoff, U, Brockmeier, D, Presek, P. Substrate affinity of the protein tyrosine kinase pp60c-src is increased on thrombin stimulation of human platelets. *Biochem. J.* 1993; 295:41-48.
- Lin, W.N., Luo, S.F., Wu, C.B., Lin, C.C. & Yang, C.M. Lipopolysaccharide induces VCAM-1 expression and neutrophil adhesion to human tracheal smooth muscle cells: involvement of Src/EGFR/PI3-K/Akt pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008; 228:256-268.
- Liu J, Jackson CW, Gartner TK. The Src requirement for washed platelet aggregation and dense granule secretion in response to stimulation by a low level gamma-thrombin. *J Thromb Haemost.* 2008; 6(6):1035-7. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.02958.x.
- Liu X, Chen Y, Wu Y, Ha T, Li C. The cardioprotection induced by lipopolysaccharide involves phosphoinositide 3-kinase/Akt and high mobility group box 1 pathways. *Biomed Res.* 2010; 24(4):324-31.

- Loegering DJ, Lennartz MR. Protein kinase C and toll-like receptor signaling. *Enzyme Res.* 2011;2011:537821.
- 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. *Platelets.* 2011; Aug 2
- Maa, M.C., Chang, M.Y., Chen, Y.J., Lin, C.H., Yu, C.J., Yang, Y.L., Li, J., Chen, P.J., Tang, C.H., Lei, H.Y. & Leu, T.H. Requirement of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-mediated Src induction and macrophage migration. *Biol Chem.* 2008; 283(46):31408-16
- Manning, G., Whyte, D., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Sciences.* 2002; 298:1912-1934.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(9):3434-9.
- Marcondes S, Turko IV, Murad F. Nitration of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase in rats after endotoxin administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001; 98(13):7146-51.
- Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 1993; 268 (17): 12231-4.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 2005;16(10):577-86.

- Maurice DH, Haslam RJ. Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. *Mol Pharmacol*. 1990;37:671– 681.
- Maxwell MJ, Yuan Y, Anderson KE, Hibbs ML, Salem HH, Jackson SP. SHIP1 and Lyn Kinase Negatively Regulate Integrin alpha IIb beta 3 signaling in platelets. *J Biol Chem*. 2004;279(31):32196-204. Epub 2004 May 27.
- McCuskey R, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovascular research*. 1996; 32(4): 752-63.
- Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med*. 1995;125(3):370-7.
- Meyer JW, Schmitt ME. A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Lett*. 2000;472(1):1-4.
- Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitricoxide synthase. *Curr Biol* 1999;9:845–848.
- Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: High-dosage Vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann. Intern. Med*. 2005; 142(1): 37-46.
- Moncada, S., Palmer, R.M. & Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol*. 1991; 43(2): 109-42.
- 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). *J Biol Chem*. 2001 Aug 10;276(32):30392-8.

- Monti M, Donnini S, Giachetti A, Mochly-Rosen D, Ziche M. DeltaPKC inhibition or varepsilonPKC activation repairs endothelial vascular dysfunction by regulating eNOS post-translational modification. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(4):746-56.
- Morello F, Perino A, Hirsch E. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovasc Res.* 2009; 1;82(2):261-71.
- Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multisite eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 2007, 42 (2): 271-9.
- Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T et al (1997) Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 388:678–682
- Muscella A, Calabriso N, Vetrugno C, Fanizzi FP, De Pascali SA, Marsigliante S. The signalling axis mediating neuronal apoptosis in response to [Pt(O,O'-acac)(γ-acac)(DMS)]. *Biochem Pharmacol.* 2011;81(11):1271-85.
- Nada, S, Okada, M, MacAuley, A., Cooper, JA, Nakagawa, H Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulation site of pp60c-src. *Nature.* 1991; 351:69-72.
- New DD, Block K, Bhandhari B, Gorin Y, Abboud HE. IGF-I increases the expression of fibronectin by Nox4-dependent Akt phosphorylation in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;302(1):C122-30. Epub 2011 Sep 21.
- Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 1995; 270(48):28495-8.
- Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem.* 1999; 274(33):22999-3005.

- Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Che. Rev.* 2004; 104(12): 6255-85.
- Norberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine.* 2001; 31 (11): 1287-1312.
- Nystrom ML, Barradas MA, Jeremy JY, Mikhailidis DP. Platelet shape change in whole blood: differential effects of endotoxin. *Thromb Haemost.* 1994; 71(5):646-50.
- Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA, Shattil SJ. *J Cell Biol.* Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with α IIb β 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. 2002; 157(2):265-75.
- Ohyashiki T, Kobayashi M, Matsui K. Oxygen-radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of ADP-induced platelet aggregation. *Arch Biochem Biophys.* 1991;288(1):282-6.
- Okada, M. & Nakagawa, H. . A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:20886-20893.
- Okada, M., Nada, S., Yamanashi, Y., Yamamoto, T. & Nakagawa, H. Csk: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of Src family kinases. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:24249-24252.
- Park S, Ahn JY, Lim MJ, Kim MH, Yun YS, Jeong G, Song JY. Sustained expression of NADPH oxidase 4 by p38 MAPK-Akt signaling potentiates radiation-induced differentiation of lung fibroblasts. *Mol Med (Berl).* 2010 Aug;88(8):807-16.
- Perera PY, Mayadas 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. *J. Immunol.* 2001; 166(1):574-81.
- Petry A, Weitnauer M, Görlach A. Receptor activation of NADPH oxidases. *Antioxidantes and Redox Signaling.* 2010; 13 (4): 467-491.

- Pigazzi A, Heydrick S, Folli F, Benoit S, Michelson A, Loscalzo J. Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets. *J Biol Chem*. 1999;274:14368–14375.
- Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, Sanguigni V, Brunelli A, Violi F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J*. 2006 Jun;20(8):1082-9.
- Pignatelli P, Lenti L, Sanguigni V, Frati G, Simeoni I, Gazzaniga PP, Pulcinelli FM, Violi F. Carnitine inhibits arachidonic acid turnover, platelet, and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284(1): H41-8.
- Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, Ferro D, Finocchi A, Rossi P, Violi F. Gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation*. 2004;110(10):1326-9.
- Plumb RD, El-Sherbeeney NA, Dixon LJ, Hughes SM, Devine AB, Leahey WJ, McVeigh GE. NAD(P)H-dependent superoxide production in platelets: the role of angiotensin II and protein kinase C. *Clin Biochem*. 2005 Jul; 38(7):607-13.
- Prevost N, Kato H, Bodin L, Shattil SJ (2007) Platelet integrin adhesive functions and signaling. *Methods Enzymol* 426:103–115.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1987;92:639–646.
- Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996;97(8):1916-23.

- Randriamboavonjy V, Fleming I. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in platelets: how is it regulated and what is it doing there? *Pharmacol Rep.* 2005;57
- Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond).* 2005;109(3):217-26.
- Redondo PC, Jardin I, Hernández-Cruz JM, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Hydrogen peroxide and peroxynitrite enhance Ca^{2+} mobilization and aggregation in platelets from type 2 diabetic patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Aug 5;333(3):794-802.
- Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Dual effect of hydrogen peroxide on store-mediated calcium entry in human platelets. *Biochem Pharmacol.* 2004 Mar 15;67(6):1065-76.
- Redondo PC, Salido GM, Rosado JA, Pariente JA. Effect of hydrogen peroxide on Ca^{2+} mobilisation in human platelets through sulphhydryl oxidation dependent and independent mechanisms. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(3):491-502.
- Rendu, F; Brohard-Bohn, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, v. 12, p. 261–273, 2001.
- Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N, Feelisch M, Fukuto J, Wink DA. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species putting perspective on stressful biological situations. *Biol. Chem.* 2004; 385(1): 1-10.
- Rosado, J.A. and Sage, S.O. Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets. *J. Physiol.* 2000; 529 (Pt 1), 159–169.
- Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, Losche W. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock.* 2002; 17(4):263-8.

- Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J. Immunol.* 2002; 168(9):4701-10.
- Sales Junior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, et al. Sepses Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. *Rev bras ter intensiva* [Internet]. 2006; 18(1): 9-17. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbti/v18n1/a03v18n1.pdf>.
- Salvemini D, Radziszewski W, Mollace V, Moore A, Willoughby D, Vane J. Diphenylene iodonium, an inhibitor of free radical formation, inhibits platelet aggregation. *Eur J Pharmacol.* 1991;199(1):15-8.
- Salvemini D, Riley DP, Lennon PJ, Wang ZQ, Currie MG, Macarthur H, Misko TP. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br. J Pharmacol.* 1999; 127(3):685-92.
- Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(11):1191-212.
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature.* 2000;404:197–201.
- Segal AW, Jones OT. Identification of a previously undescribed cytochrome b in human neutrophils and its relationship to phagocytosis-induced oxidase activity [proceedings]. *Biochem Soc Trans.* 1979 Feb;7(1):187-8

- Seno T, Inoue N, Gao D, Okuda M, Sumi Y, Matsui K, Yamada S, Hirata KI, Kawashima S, Tawa R, Imajoh-Ohmi S, Sakurai H, Yokoyama M. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. *Thromb Res.* 2001;103(5):399-409
- Seo JS, Park JY, Choi J, Kim TK, Shin JH, Lee JK, Han PL. NADPH oxidase mediates depressive behavior induced by chronic stress in mice. *J Neurosci.* 2012 Jul 11;32(28):9690-9.
- 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- α expression in neonatal rat cardiomyocytes: The role of reactive oxygen species. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 2006; 351(4):947-52.
- Shattil SJ. *Thromb Haemost.* Signaling through platelet integrin α IIb β 3: inside-out, outside-in, and sideways 1999;82(2):318-25.
- Shattil SJ (2009). The β 3 integrin cytoplasmic tail: protein scaffold and control freak. *J Thromb Haemost* 7(Suppl 1):210–213
- Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11:288–300
- Sheu JR, Hung WC, Kan YC, Lee YM, Yen MH. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of Escherichia coli lipopolysaccharide in human platelets. *Br. J. Haematol.* 1998; 103(1):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. *Eur. J. Haematol.* 1999; 62(5):317-26.

- 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. *Curr Neurovasc Res*. 2011 Aug 1;8(3):200-9.
- Smith JA, Weidemann MJ. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993 ;162(2):261-8.
- Smolinska, MJ, Horwood, NJ, Page, TH, Smallie, T, Foxwell, B.M. Chemical inhibition of Src family kinases affects major LPS-activated pathways in primary human macrophages. *Mol. Immunol*. 2008; 45:990-1000.
- Somani, AK, Bignon, JS, Mills, GB, Siminovitch, KA, Branch, DR. Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem*. 1997; 272:21113-21119.
- Somers MJ, Burchfield JS, Harison DG. Evidence for a NADH/NADPH oxidase in human umbilical vein endothelial cells using electron spin resonance. *Antioxid Redox Signal*. 2000; 2(4): 779-87.
- Soriani, A., Moran, B., de Virgilio, M., Kawakami, T., Altman, A., Lowell, C., Eto, K. and Shattil, S.J. A role for PKC θ in outside-in α (IIb) β 3 signaling. *J. Thromb. Haemost*. 2006; 4, 648–655.
- Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. 2011; *J Mol Med*
- Stojanovic A, Marjanovic JA, Brovkovich VM, Peng X, Hay N, Skidgel RA, Du X. A phosphoinositide 3-kinase-AKT-nitric oxide-cGMP signaling pathway in stimulating platelet secretion and aggregation. *J Biol Chem*. 2006 Jun 16;281(24):16333-9. Epub 2006 Apr 13.
- Stokes KY, Russel JM, Jennings MH, Alexander JS, Granger DN. Platelet-associated NAD(P)H oxidase contributes to the thrombogenic phenotype induced by hypercholesterolemia. *Free Radic. Biol. Med*. 2007; 43(1): 22-30.

- Strehl, A., Munnix, I.C., Kuijpers, M.J., van der Meijden, P.E., Cosemans, J.M., Feijge, M.A., Nieswandt, B. and Heemskerk, J.W. Dual role of platelet protein kinase C in thrombus formation: stimulation of pro-aggregatory and suppression of procoagulant activity in platelets. *J. Biol. Chem.* 2007; 282, 7046–7055.
- Suzuki Y, Lehrer RI. NAD(P)H oxidase activity in human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate. *J Clin Invest.* 1980 Dec;66(6):1409-18.
- Tarpey MM, Beckman JS, Ischiropoulos H, Gore JZ, Brock TA. Peroxynitrite stimulates vascular smooth muscle cell cyclic GMP synthesis. *FEBS Lett.* 1995 May 15;364(3):314-8.
- Thomas JA, Mallis RJ. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. *Exp Gerontol.* 2001;36(9):1519-26.
- Tlili A, Erard M, Faure MC, Baudin X, Piolot T, Dupré-Crochet S, Nüsse O. Stable accumulation of p67phox at the phagosomal membrane and ROS production within the phagosome. *J Leukoc Biol.* 2012;91(1):83-95.
- Touyz R.M;Fatiha T.;Ernesto S.L. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodeling in hypertension. *Clinical and experimental pharmacology & physiology.* 2003; 30(11):860-866.
- Trepakova ES, Cohen RA, Bolotina VM. Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase-dependent refilling of Ca²⁺ stores. *Circ Res.* 1999;84:201–209.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 39(1): 44-84.

- Vitseva O, Flockhart DA, Jin Y, Varghese S, Freedman JE. The effects of tamoxifen and its metabolites on platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(3):1144-50..
- Vuaden FC, Furstenau CR, Savio LE, Sarkis JJ, Bonan CD. Endotoxemia alters nucleotide hydrolysis in platelets of rats. *Platelets*. 2009; 20(2):83-9.
- Wang W, Suzuki Y, Tanigaki T, Rank DR, Raffin TA. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on septic lung injury in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(5 Pt 1):1449-52
- Ward JR, Bingle L, Judge HM, Brown SB, Storey RF, Whyte MK, Dower SK, Buttle DJ, Sabroe I. Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. *Thromb Haemost*. 2005; 94(4):831-8.
- Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 1999; 99(15):2027-33.
- Watson, S.P. and Hambleton, S. (1989) Phosphorylation-dependent and -independent pathways of platelet aggregation. *Biochem. J*. 258, 479–485.
- Whitworth NH, Barradas MA, Mikhailidis DP, Dandona P. An investigation into the effects of bacterial lipopolysaccharide on human platelets. *Eur J Haematol*. 1989;43(2):112-9.
- Wolf G. Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. *Histol Histopathol*. 1997; 12(1): 251-61.
- Wong, S., Reynolds, A.B. & Papkoff, J. Platelet activation leads to increased csrc kinase activity and association c-Src with an 85-kD tyrosine phosphoprotein. *Oncogene*. 1992; 7:2407-2415.

- Wu F, Schuster DP, Tyml K, Wilson JX. Ascorbate inhibits NADPH oxidase subunit p47phox expression in microvascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42(1):124-31.
- Xiang B, Zhang G, Liu J, Morris AJ, Smyth SS, Gartner TK, Li Z. A G(i) -independent mechanism mediating Akt phosphorylation in platelets. *J Thromb Haemost.* 2010 Sep;8(9):2032-41. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.03969.x.
- Yamamori T, Inanami O, Nagahata H, Cui Y, Kuwabara M. Roles of p38 MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett.* 2000 Feb 11;467(2-3):253-8
- Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D, Brass LF. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem.* 2002 Nov 29;277(48):46035-42.
- Yap CL, Anderson KE, Hugan SC, Dopheide SM, Salem HH, Jackson SP. Essential role for phosphoinositide 3-kinase in shear-dependent signaling between platelet glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha(IIb)beta(3). *Blood.* 2002 Jan 1;99(1):151-8
- Yono S, Tokumitsu H, Soderling TR. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature.* 1998;396(6711):584-7.
- Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc. Res.* 2002; 56(1):126-34.
- 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. *J Immunol.* 2009;182(12):7997-8004

- Zhang H, Joseph J, Feix J, Hogg N, Kalyanaraman B. Nitration and oxidation of a hydrophobic tyrosine probe by peroxynitrite in membranes: comparison with nitration and oxidation of tyrosine by peroxynitrite in aqueous solution. *Biochemistry*. 2001; 40(25):7675-86.

- Zhang J., Banfic H., Straforini F., Tosi L., Volinia S. and Rittenhouse S. E. A Type II Phosphoinositide 3-Kinase Is Stimulated via Activated Integrin in Platelets. A source of phosphatidylinositol 3-phosphate. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 14081-14083.

- Zielinski, T, Wachowicz, B, Saluk-Juszczak, J, Kaca, W. Polysaccharide part of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide may be responsible for the stimulation of platelet adhesion to collagen. *Platelets*. 2002; 13:419-424.