



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira

**Envolvimento da SUMOilação de proteínas na proteção renal após o choque  
hemorrágico em ratos**

Florianópolis

2023

Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira

**Envolvimento da SUMOilação de proteínas na proteção renal após o choque  
hemorrágico em ratos**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia da Universidade Federal de  
Santa Catarina como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Regina de Sordi, Dra.  
Coorientadora: Profa. Helena Cimarosti, Dra.

Florianópolis

2023

Oliveira, Filipe Rodolfo Moreira Borges de  
Envolvimento da SUMOilação de proteínas na proteção renal  
após o choque hemorrágico em ratos /Filipe Rodolfo Moreira  
Borges de Oliveira ; orientador, Regina de Sordi, coorientador,  
Helena Iturvides Cimarosti, 2023.  
114 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Falência de múltiplos órgãos. 3. isquemia  
e reperfusão. 4. choque hemorrágico. 5. Small ubiquitin-like  
modifier. I. Sordi, Regina de . II. Cimarosti, Helena Iturvides.  
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira

**Envolvimento da SUMOilação de proteínas na proteção renal após o choque hemorrágico em ratos**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 14 de agosto de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. José Eduardo da Silva Santos, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Ana Paula Couto Davel, Dra.  
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Marcelo Farina, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof. José Eduardo da Silva Santos, Dr.  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Profa. Regina de Sordi, Dra.  
Orientadora

Florianópolis, 2023.

*Este trabalho é dedicado aos meus pais, Péricles e Rosemary,  
em agradecimento por todos os seus ensinamentos.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Regina de Sordi, pelos incontáveis ensinamentos, conselhos e boa convivência. A fama que a precedia antes de eu cogitar pedir para ser orientado por ela era de “exigente e eficiente”, e esse tempo de convívio confirmou o que era dito. Porém, a convivência também demonstrou que essa “exigência” era atenciosa, compreensiva e apoiadora. Não tenho palavras para agradecer o companheirismo durante esses anos. Nos momentos mais difíceis da minha vida, ela apoiou e compreendeu. Sempre levarei com orgulho o título de “primeiro aluno de doutorado”.

À minha coorientadora, Helena Cimarosti, por todo o apoio técnico-científico e valioso auxílio na concretização da oportunidade de realizar alguns dos meus experimentos no maior hospital de pesquisa da Europa: o Hospital Charité. Agradeço à equipe do Laboratório de Investigação Neuroquímica pela ajuda experimental também.

Ao supervisor do doutorado sanduíche, Professor Christoph Harms, e à Doutora Gisela Lättig pela oportunidade de fazer experimentos no *Centre for Stroke Research Berlin* e doação das partículas de *lentivirus* utilizados neste estudo.

À banca avaliadora deste trabalho, Professora Ana Paula, Professor Marcelo Farina e Professor José Eduardo, assim como os avaliadores suplentes, Professor Lucas Pinheiro e Professora Mariana Appel, agradeço imensamente o tempo e a atenção disponibilizados para contribuírem com o meu trabalho. E desejo que meu trabalho tenha acrescentado algo relevante às suas bagagens científicas, além de contribuir com a área de estudo em questão.

Aos Professores Jamil Assreuy, Daniel Fernandes, Geisson Nardi e Renata Lataro pela boa convivência e ensinamentos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Renal (LABCARE). Os aprendizados e discussões durante os nossos seminários foram de grande relevância para a minha formação.

Aos meus queridos colegas do LABCARE, os “catitos”, agradeço pela ótima convivência, momentos de aprendizado, de risadas e conversas. Apesar da pandemia ter tirado parte da nossa convivência diária logo no início, isso não foi capaz de diminuir o carinho que temos uns pelos outros. Desejo tudo de melhor na vida de cada um de vocês.

Agradeço aos funcionários da UFSC, principalmente da Secretaria Integrada de Pós-Graduação, do Biotério e do Laboratório multiusuário. Seu compromisso e empenho têm sido essenciais para o bom andamento da jornada acadêmica de muitos brasileiros.

À técnica Daiane Bobermin, agradeço pela imensurável ajuda técnica no preparo de amostras do amado e odiado *Western blotting* e pela amizade que surgiu desde a primeira carona, 6 anos atrás, até os rolês de hoje.

Agradeço à querida Hanna Pillmann, a aluna de iniciação científica que coorientei, que me ajudou a estabelecer o protocolo de choque hemorrágico no LABCARE.

Entendendo que pesquisa não se faz sozinho, agradeço a todos os pesquisadores que me ajudaram de diferentes formas. Professor Alfeu e sua equipe do LABCANCER por terem fornecido os protocolos de estresse oxidativo utilizados neste trabalho. Professor Rodrigo Bainy pela doação de reagentes. Professora Lina Zingali e técnica Ana, da UFRJ, pelos experimentos de proteômica que entrarão no artigo. Professor Rusan Catar (Hospital Charité) pelo fornecimento das células HK-2 utilizadas neste trabalho.

Aos queridos Éricks Sousa, Marina Delgobo, Marcela Ferreira e Thiele Rosales, agradeço as boas memórias que eu tenho da pós-graduação. Estiveram comigo desde o mestrado e continuarão representando uma das melhores partes da pós-graduação: as amizades que a gente faz pelo caminho.

À querida Adri, uma pessoa incrível e que está comigo desde a era NOLab.

Ao César Teló, agradeço pelo companheirismo, paciência e compreensão. Tê-lo ao meu lado nos momentos de dificuldades fez toda a diferença na obtenção deste trabalho. Ah, e obrigado pela ajuda no inglês.

Agradeço a toda minha família. Avó, tias, tios e primos que falam com orgulho sobre mim. Em especial, à minha irmã, Karen, e meu cunhado, Rômulo, agradeço por terem me dado sobrinhos lindos que me impulsionam a trabalhar por um mundo mais justo, amável e respeitoso.

Aos meus queridos e amados pais. Eu agradeço por viabilizarem minha dedicação exclusiva a fazer o que eu quero e gosto: a pesquisa. Ao meu pai, Péricles, a quem hoje me recordo com um coração cheio de saudades, agradeço pelo exemplo de ser humano que ele foi para mim. E à minha mãe, Rosemary, eu agradeço pelo privilégio de ter alguém que, muitas vezes, abriu mão de si própria em função dos

seus. Este trabalho, este título e, mais importante, quem eu sou hoje, é tudo fruto do amor que eu recebi de vocês.

Agradeço às agências de fomento CAPES e CNPq.

## RESUMO

O choque hemorrágico (CH) é uma condição grave que leva à disfunção de múltiplos órgãos e pode resultar em morte. A lesão ocorre devido a um sangramento excessivo seguido por reperfusão, denominada lesão de isquemia-reperfusão. Sabe-se que o estresse celular pode levar ao aumento dos níveis das proteínas pequenas modificadoras semelhantes à ubiquitina (SUMO), que desempenham um papel na proteção dos órgãos. Neste estudo, investigamos a hipótese de que a SUMOilação aumenta após o CH com o objetivo de proteger os rins. Para isso, utilizamos ratos Wistar machos e induzimos o CH através da retirada controlada de sangue até que a pressão arterial média atingisse  $40 \pm 2$  mmHg. Após 60 ou 90 minutos, o sangue foi reinfundido nos animais. Coletamos amostras de sangue, rim e fígado em diferentes momentos após a reperfusão para avaliar o dano orgânico e o perfil de SUMO1/2/3. Utilizamos também células renais humanas (HK-2) para investigar o papel da SUMOilação em um modelo de lesão de hipóxia-reoxigenação por privação de oxigênio e glicose (OGD). Os resultados mostraram que os animais submetidos a 60 minutos de CH não apresentaram disfunção orgânica significativa. No entanto, aqueles que passaram por 90 minutos de CH apresentaram elevação progressiva de marcadores plasmáticos de danos gerais e hepáticos por até 24 horas. Por outro lado, os marcadores de função renal aumentaram após 2 horas do fim do CH e retornaram aos níveis basais dentro de 24 horas. Foi observado que os rins apresentaram um menor aumento no estresse oxidativo em comparação com o fígado, devido a mecanismos antioxidantes mais eficientes. Além disso, foi observado ativação de proteínas apoptóticas e dano histológico no fígado, enquanto nos rins não foram encontradas alterações significativas. Ao analisar a SUMOilação, foi observado principalmente um aumento pronunciado nos níveis totais de SUMO2/3-ilação nos rins, porém nenhuma alteração foi detectada no tecido hepático. Em experimentos com células renais HK-2, verificamos que a inibição da SUMOilação resultou em um aumento na morte celular, enquanto a superexpressão de SUMO1 ou SUMO2 proporcionou proteção celular. Em conclusão, foi possível estabelecer um modelo de falência de múltiplos órgãos induzida pelo CH, sendo necessário um tempo mínimo de 90 minutos para a ocorrência dessa disfunção. A falência orgânica induzida persistiu por pelo menos 24 horas. Observamos um dano renal reduzido em comparação com o fígado, o qual foi associado a um aumento na SUMOilação nesse órgão. A inibição da SUMOilação resultou em maior morte celular renal, enquanto a superexpressão de SUMO1 e SUMO2 proporcionou proteção celular, sugerindo que a resistência renal à isquemia está associada ao aumento da SUMOilação nesse tecido.

**Palavras-chave:** falência de múltiplos órgãos; modificação pós-traducional; SUMOilação.

## ABSTRACT

Hemorrhagic shock (HS) is a severe condition that leads to multiorgan dysfunction and can result in death. The injury occurs due to excessive bleeding followed by reperfusion, known as ischemia-reperfusion injury. It is known that cellular stress can lead to an increase in levels of small ubiquitin-like modifier (SUMO) proteins, which play a role in organ protection. In this study, we investigated the hypothesis that SUMOylation increases after HS to protect the kidneys. Male Wistar rats were subjected to HS by controlled blood withdrawal until the mean arterial pressure reached  $40 \pm 2$  mmHg. After 60 or 90 minutes, the withdrawn blood was reinfused into the animals. Blood, kidney, and liver samples were collected at different time points after reperfusion to assess organ damage and the SUMO1/2/3 profile. Additionally, human renal cells (HK-2) were used to study the role of SUMOylation in a model of hypoxia-reoxygenation injury induced by oxygen and glucose deprivation (OGD). The results showed that animals subjected to 60 minutes of HS did not exhibit significant organ dysfunction. However, those subjected to 90 minutes of HS showed progressive elevation of general and hepatic damage markers for up to 24 hours. Conversely, renal function markers increased after 2 hours of HS and returned to baseline levels within 24 hours. The kidneys exhibited a smaller increase in oxidative stress compared to the liver, due to more efficient antioxidant mechanisms. Activation of apoptotic proteins and histological damage were observed in the liver, while no significant changes were found in the kidneys. Analysis of SUMOylation showed a pronounced increase in total SUMO2/3ylation levels in the kidneys, while no changes were detected in the hepatic tissue. In experiments with HK-2 renal cells, inhibition of SUMOylation resulted in increased cell death, whereas overexpression of SUMO1 or SUMO2 provided cellular protection. In conclusion, we established a model of HS-induced multiorgan failure, with a minimum time requirement of 90 minutes for the occurrence of this dysfunction. Organ failure persisted for at least 24 hours. We observed reduced renal damage compared to the liver, which was associated with increased SUMOylation in the kidneys. Inhibition of SUMOylation increased renal cell death, while overexpression of SUMO1 and SUMO2 provided cellular protection, suggesting that renal resistance to ischemia is associated with increased SUMOylation in this tissue.

**Keywords:** multiple organ failure; post-translational modification; SUMOylation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais mecanismos reflexos que atuam nos sistemas cardiovascular e renal ativados durante o choque hemorrágico .....	25
Figura 2 – Estruturas tridimensionais das proteínas SUMO e suas distribuições .....	36
Figura 3 – Via bioquímica de SUMOilação e deSUMOilação .....	38
Figura 4 – Diferentes proteases específicas de SUMO e suas atividades de catálise nas fases de maturação e desconjugação .....	39
Figura 5 – Hipótese ilustrada do trabalho .....	43
Figura 6 – Esquema do protocolo de choque hemorrágico .....	46
Figura 7 – Duração do choque hemorrágico é determinante para a disfunção de órgãos .....	56
Figura 8 – A duração da fase de descompensação está diretamente relacionada ao dano hepático, mas não à disfunção renal .....	57
Figura 9 – Evolução temporal dos marcadores de lesão hepática e disfunção renal após o choque hemorrágico .....	58
Figura 10 – Efeito do choque hemorrágico em marcadores sistêmicos e parâmetros cardiovasculares .....	59
Figura 11 – Níveis de <i>kidney injury molecule-1</i> no tecido renal de animais submetidos ao choque hemorrágico .....	60
Figura 12 – Achados histológicos no rim e fígado após choque hemorrágico .....	61
Figura 13 – Evolução dos marcadores de estresse oxidativo nos tecidos renais e hepáticos após o choque hemorrágico .....	63
Figura 14 – Ativação de marcadores de morte celular nos tecidos renais e hepáticos após choque hemorrágico .....	65
Figura 15 – Níveis totais e conjugados de SUMO1 no fígado e nos rins após o choque hemorrágico .....	67
Figura 16 – Níveis totais e conjugados de SUMO2/3 no fígado e nos rins após o choque hemorrágico .....	68
Figura 17 – Efeito do TAK-981 na viabilidade celular após privação de oxigênio e glicose seguida de reoxigenação .....	69
Figura 18 – Efeito da expressão aumentada de proteínas SUMO na viabilidade celular após privação de oxigênio e glicose seguida de reoxigenação .....	70
Figura 19 – Resumo gráfico das conclusões .....	84

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Parâmetros retirados de estudos publicados que realizaram o protocolo de choque hemorrágico com pressão fixa e análises não-agudas.....	31
Quadro 2 – Protocolo de choque hemorrágico utilizado para padronização do modelo .....	46
Quadro 3 – Protocolo de choque hemorrágico utilizado para avaliação temporal da disfunção orgânica .....	47
Quadro 4 – Protocolo de privação de oxigênio e glicose seguido de reoxigenação em células HK-2.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	<i>Adenilil ciclase</i> (ciclase de adenilil)
ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (monosfosfato cíclico de adenosina)
ANOVA	Análise de variância
ARRIVE	<i>Animal research: reports of in vivo experimentation</i>
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (trifosfato de adenosina)
BCA	Ácido bicinconínico
BSS	<i>Balanced salt solution</i> (solução salina balanceada)
CH	Choque hemorrágico
CK	Creatina cinase
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados ao dano)
DC	Débito cardíaco
DMEN/F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12</i>
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i> (aprimorador de quimioluminescência)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (proteína fluorescente verde)
GMPc	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> (monosfosfato cíclico de guanosina)

GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> (receptor acoplado à proteína G)
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i> (cinase de receptor acoplado à proteína G)
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HEK293	<i>Human embryonic kidney cell 293</i> (célula renal embrionária humana 293)
HK-2	<i>Human kidney cell 2</i> (célula de rim humana 2)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidase de rábano silvestre)
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IP	Iodeto de propídeo
KIM-1	<i>Kidney injury molecule 1</i> (molécula do dano renal 1)
LDH	Lactato desidrogenase
LTV	Lentivírus
MDA	Malondialdeído
NADPH	Dinucleotídeo de Nicotinamida Adenina
NEM	N-etilmaleimida
OGD	<i>Oxygen-glucose deprivation</i> (privação de oxigênio e glicose)
PAM	Pressão arterial média
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão salina fosfato)

PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PKG	Proteína cinase G
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipase C
PVDF	Polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
R-SH	Tiol livre (tiol reduzido)
RVP	Resistência vascular periférica
SAE	<i>SUMO Activation Enzyme</i> (enzima ativadora de SUMO)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SENP	<i>SUMO-specific protease</i> (protease específica de SUMO)
SERCA2a	Bomba de cálcio do retículo sarcoendoplasmático 2a
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i> (pequeno modificador semelhante à ubiquitina)
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> (substâncias reagentes do ácido tiobarbitúrico)
TCA	Ácido tricloroacético
Ubc9	Enzima conjugadora E2
Ψ	Resíduo de aminoácido hidrofóbico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>21</b>
2.1	CHOQUE HEMORRÁGICO .....	21
2.1.1	<b>Epidemiologia do choque hemorrágico (CH)</b> .....	<b>21</b>
2.1.2	<b>Mecanismos fisiopatológicos do choque hemorrágico</b> .....	<b>22</b>
2.1.2.1	<i>Hemorragia e suas consequências</i> .....	22
2.1.2.2	<i>Resposta compensatória do organismo ao choque hemorrágico</i> .....	23
2.1.2.3	<i>Descompensação pós-choque hemorrágico</i> .....	26
2.1.2.4	<i>Dano de reperfusão</i> .....	27
2.1.3	<b>Disfunção orgânica associada ao choque hemorrágico</b> .....	<b>28</b>
2.1.4	<b>Tratamentos do choque hemorrágico e da falência orgânica</b> .....	<b>29</b>
2.1.5	<b>Pesquisa básica e translacional em choque hemorrágico</b> .....	<b>30</b>
2.1.5.1	<i>Modelos animais de choque hemorrágico</i> .....	30
2.1.5.2	<i>Modelos in vitro de lesão de hipóxia-reoxigenação</i> .....	32
2.2	SUMOILAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	33
2.2.1	<b>Definição e características da SUMOilação</b> .....	<b>34</b>
2.2.1.1	<i>A descoberta da SUMOilação</i> .....	34
2.2.1.2	<i>Aspectos estruturais das proteínas SUMO</i> .....	34
2.2.2	<b>Mecanismos e etapas da SUMOilação</b> .....	<b>36</b>
2.2.2.1	<i>Via bioquímica da SUMOilação</i> .....	36
2.2.2.2	<i>DeSUMOilação</i> .....	38
2.2.3	<b>A SUMOilação em isquemias</b> .....	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO DO TRABALHO</b> .....	<b>42</b>
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE DO TRABALHO</b> .....	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
5.1	ANIMAIS .....	44
5.2	CHOQUE HEMORRÁGICO (CH) .....	44
5.3	MARCADORES PLASMÁTICOS DE DANO E DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS 47	
5.4	DOSAGEM DE LACTATO .....	47
5.5	MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO .....	48

5.5.1	<b>Malondialdeído</b> .....	<b>48</b>
5.5.2	<b>Catalase</b> .....	<b>48</b>
5.5.3	<b>Tióis livres (R-SH)</b> .....	<b>49</b>
5.5.4	<b>Glutaciona redutase (GR)</b> .....	<b>49</b>
5.5.5	<b>Glutaciona peroxidase (GPx)</b> .....	<b>49</b>
5.6	DOT E WESTERN BLOTTING .....	50
5.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	51
5.8	EXPERIMENTOS COM CULTURA DE CÉLULAS: <i>HUMAN KIDNEY-2</i> (HK-2)	51
5.8.1	<b>Privação de oxigênio e glicose</b> .....	<b>52</b>
5.8.2	<b>Tratamento com inibidor da enzima ativadora de SUMO 1 (SAE1)</b> .....	<b>53</b>
5.8.3	<b>Transfecção viral</b> .....	<b>53</b>
5.8.4	<b>Ensaio de iodeto de propídeo (IP)</b> .....	<b>54</b>
5.9	REAGENTES .....	54
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	54
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
6.1	PROCOLOS DE CHOQUE HEMORRÁGICO (CH) COM PRESSÃO FIXA E NÃO-AGUDOS .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
6.2	ESTABELECIMENTO DA DURAÇÃO DO CHOQUE .....	56
6.3	RELAÇÃO DO DANO HEPÁTICO/DISFUNÇÃO RENAL E TEMPO DE DESCOMPENSAÇÃO.....	57
6.4	AVALIAÇÃO TEMPORAL DO DANO HEPÁTICO E DISFUNÇÃO RENAL INDUZIDOS POR CHOQUE HEMORRÁGICO.....	58
6.5	AVALIAÇÃO TEMPORAL DE MARCADORES GERAIS DE DISFUNÇÃO ORGÂNICA E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES .....	59
6.6	AVALIAÇÃO TEMPORAL DO MARCADOR DE DANO RENAL.....	60
6.7	ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS INDUZIDAS PELO CHOQUE HEMORRÁGICO.....	60
6.8	AVALIAÇÃO TEMPORAL DE MARCADORES ESTRESSE OXIDATIVO TISSULAR APÓS O CHOQUE HEMORRÁGICO .....	62
6.9	O CHOQUE HEMORRÁGICO ATIVA MORTE CELULAR NO FÍGADO, MAS NÃO NO RIM.....	64
6.10	PERFIL DE SUMO1-ILAÇÃO NOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL APÓS O CHOQUE HEMORRÁGICO .....	66

6.11	PERFIL DE SUMO2/3-ILAÇÃO NOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL APÓS O CHOQUE HEMORRÁGICO .....	67
6.12	INIBIDOR DA SUMOILAÇÃO PIORA O DANO INDUZIDO POR PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE EM CÉLULAS RENAIAS HUMANAS (HK-2) .....	68
6.13	SUPEREXPRESSÃO DE SUMO1 OU SUMO2 PROTEGE CONTRA MORTE CELULAR INDUZIDA PELA PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE .....	69
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE A – LACTATO PRÉ-REPERFUSÃO.....</b>	<b>106</b>
	<b>APÊNDICE B – ESTABELECIMENTO DA DURAÇÃO DA HIPÓXIA NO ESPERIMENTOD DE PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE.....</b>	<b>107</b>
	<b>APÊNDICE C – CÉLULAS CONTROLE – EXPERIMENTO TAK-981.....</b>	<b>108</b>
	<b>APÊNDICE D – CÉLULAS CONTROLE – EXPERIMENTO SUPEREXPRESSÃO SUMO1 E SUMO2.....</b>	<b>109</b>
	<b>ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....</b>	<b>110</b>
	<b>ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO .....</b>	<b>111</b>
	<b>ANEXO C – ARTIGOS EM PREPARAÇÃO OU SUBMETIDOS.....</b>	<b>112</b>
	<b>ANEXO D – CAPÍTULO DE LIVRO COM OBJETIVO DE POPULARIZAÇÃO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA.....</b>	<b>113</b>
	<b>ANEXO E – POSTAGENS PRODUZIDAS PARA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA NO INSTAGRAM® DO PPGFMC/UFSC .....</b>	<b>114</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O choque hemorrágico (CH) é a principal causa de morte evitável em indivíduos com até 45 anos após trauma (EASTRIDGE; HOLCOMB; SHACKELFORD, 2019). É caracterizado por uma perda grave de sangue, resultando em perfusão sanguínea inadequada (CANNON, 2018). Conseqüentemente, mecanismos compensatórios são ativados, levando à vasoconstrição periférica e redução do suprimento sanguíneo para os tecidos (KEEL; TRENTZ, 2005). Embora essencial, a reoxigenação de tecidos isquêmicos por meio de reposição de fluidos ou transfusão de sangue pode exacerbar danos aos órgãos, um processo conhecido como lesão de isquemia-reperfusão (WU et al., 2018), que pode causar disfunção de múltiplos órgãos (HUTCHINGS et al., 2018).

A maioria dos pacientes que passam por traumas morre devido à hemorragia (EASTRIDGE; HOLCOMB; SHACKELFORD, 2019). No entanto, entre aqueles que sobrevivem, a ocorrência de disfunção de múltiplos órgãos varia amplamente de 7% a 58,5% (FRÖHLICH et al., 2014; HUTCHINGS et al., 2017; MINEI et al., 2012; MORRISON et al., 2013; PROBST et al., 2009), e o prognóstico piora à medida que cada sistema é afetado. Escores clínicos revelam que indicadores de falência respiratória, neurológica, de coagulação, cardíaca e hepática são mais comumente observados do que os de falência renal (HUTCHINGS et al., 2017). Além disso, embora a lesão renal aguda seja considerada uma das complicações pós-traumáticas mais perigosas, sua incidência permanece relativamente baixa, afetando apenas até 10% dos pacientes de trauma (ÁVILA MARTÍNEZ et al., 2013; AWAD et al., 2009; BAGSHAW, 2006; HOSTE; SCHURGERS, 2008). Isso sugere que o sistema renal é afetado apenas em uma pequena fração de pacientes, o que indica potencialmente a existência de mecanismos de proteção/adaptação inerentes aos rins.

Mecanismos de proteção celular são conhecidos por serem ativados por diferentes insultos. Em relação à lesão de isquemia-reperfusão, é bem conhecido que a SUMOilação desempenha um papel crucial na proteção de neurônios após isquemia cerebral (CIMAROSTI et al., 2008, 2012; DATWYLER et al., 2011; LI et al., 2021; SUN et al., 2021). Foi inicialmente descoberto que essa modificação pós-traducional estava aumentada nos órgãos de animais hibernantes como uma maneira de proteger as células do dano causado pelo suprimento limitado de oxigênio e nutrientes durante a hibernação (LEE et al., 2007).

A SUMOilação é caracterizada pela ligação covalente de uma das cinco proteínas pequenas semelhantes à ubiquitina (SUMO, do inglês *small ubiquitin-like modifier*) a outras proteínas-alvo, resultando em alterações na localização subcelular, estabilidade e função (FLOTHO; MELCHIOR, 2013). As proteínas SUMO1, SUMO2 e SUMO3 são as mais amplamente estudadas, sendo que SUMO2 e 3 são frequentemente referidas como SUMO2/3 devido a similaridades estruturais (SU; LI, 2002). Além disso, vários estudos demonstraram que a SUMOilação, especialmente mediada por SUMO2/3, está envolvida na resposta ao estresse celular (GOLEBIEWSKI et al., 2009; GUO; HENLEY, 2014; YANG et al., 2012).

Portanto, o objetivo inicial deste estudo foi avaliar a intensidade da disfunção de múltiplos órgãos induzida pelo protocolo de CH e determinar se o organismo ativaria a SUMOilação de proteínas como um mecanismo de proteção dos tecidos.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 CHOQUE HEMORRÁGICO

#### 2.1.1 Epidemiologia do choque hemorrágico (CH)

Traumas, intencionais ou não, são a causa mais prevalente de mortes evitáveis em jovens, representando cerca de 8% de todas as mortes no mundo (OMS, 2021). O impacto físico, emocional e social resultante de eventos traumáticos pode ser devastador, levando a complicações graves e até mesmo à morte. No Brasil, observa-se um aumento alarmante no número de internações em unidades de terapia intensiva (UTIs) ao longo dos anos por consequência de traumas. Entre 1998 e 2015, o número de internações em UTI de pacientes de trauma dobrou, passando de 17,1 para 32,8 internações por 100 mil habitantes (LENTSCK; SATO; MATHIAS, 2019).

De acordo com o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), a principal causa desse aumento é o crescimento de 50,3% no número de acidentes automobilísticos (IPEA, 2018). Dentre as complicações enfrentadas pelos pacientes traumatizados, o choque hemorrágico (CH) é uma das principais causas de morte. Estima-se que entre 18% e 40% das mortes relacionadas a traumas sejam atribuídas ao choque hemorrágico (DEMETRIADES et al., 2004; DUTTON et al., 2010; LENTSCK; SATO; MATHIAS, 2019; MOORE et al., 2010; PAPA et al., 2006). Um estudo em um hospital brasileiro demonstrou que as regiões mais afetadas são o abdômen (32%), o tórax (28%) e a região pélvica (10%) (TRAJANO; PEREIRA; FRAGA, 2014). A maioria das mortes por CH ocorre nas primeiras 24 horas após o trauma (BANSAL et al., 2009; KAUVAR; LEFERING; WADE, 2006), evidenciando a necessidade de uma resposta rápida e eficaz para evitar complicações fatais.

Além disso, hemorragias não controladas em salas de cirurgias representam outra fonte significativa de mortes relacionadas ao CH. Estudos indicam que cerca de 80% das mortes ocorridas durante procedimentos cirúrgicos são atribuídas a hemorragias não controladas (SAUAIA, 1995). Outra causa comum de CH é a ruptura de aneurismas (CANNON, 2018). Assim, o CH, como complicação comum de traumas e cirurgias, exige medidas preventivas e intervenções rápidas para minimizar seu impacto.

## 2.1.2 Mecanismos fisiopatológicos do choque hemorrágico

### 2.1.2.1 Hemorragia e suas consequências

Independentemente da causa da hemorragia, o CH é uma forma de choque hipovolêmico caracterizada pela perda intensa de sangue que culmina com uma redução do aporte sanguíneo às células (CANNON, 2018). A redução do volume sanguíneo tem efeitos diretos nos valores de pressão arterial, uma vez que estes valores são o produto do débito cardíaco (DC) e da resistência vascular periférica (RVP) (GUYTON, 1981). Assim, uma vez que o volume sanguíneo é reduzido por ocasião da hemorragia, tanto o DC quanto a RVP serão reduzidos, e o choque hipovolêmico se instala (KUO; PALMER, 2022; WIGGERS; WERLE, 1942).

Do ponto de vista bioquímico, o CH é caracterizado pela insuficiência em atender a demanda celular de oxigênio para a manutenção do metabolismo aeróbico (BARBEE; REYNOLDS; WARD, 2010). Assim, as células passam a produzir o trifosfato de adenosina (ATP), a moeda energética do organismo, através do metabolismo anaeróbio. Apesar de não exigir oxigênio, essa via de produção energética é menos eficiente. Na ausência de oxigênio, o produto final da glicólise, que é o piruvato, não entra no ciclo do ácido cítrico e passa a ser convertido em lactato. O lactato acumulado, juntamente com fosfatos inorgânicos e espécies reativas, causam uma série de malefícios à dinâmica celular (CHAUDRY, 1983). O acúmulo desses produtos, juntamente com a insuficiência de ATP, gera uma série de alterações na homeostase celular como redução do pH, dano mitocondrial, produção de mediadores inflamatórios e ativação de vias de morte celular. Estes componentes são padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*), que, uma vez liberados, são reconhecidos por células imunes e causam uma intensa resposta inflamatória (ZHANG et al., 2010).

A resposta inflamatória produzida pela liberação dos DAMPs, juntamente com a diminuição do pH, induzem um desequilíbrio eletrolítico, causando degeneração hídrica e edema celular (HALJAMÄE, 1988; KAJIHARA; HIRATA; MIYOSHI, 1977; MIRZAYAN et al., 2012). Se a hemorragia não for controlada e a perfusão sanguínea não for normalizada, as células entraram num processo de ruptura de membranas, causando necrose e apoptose e, em última análise, disfunção tecidual e orgânica.

### 2.1.2.2 *Resposta compensatória do organismo ao choque hemorrágico*

A hemorragia e a redução do aporte sanguíneo aos tecidos ativam uma série de mecanismos reflexos cujos principais objetivos são reestabelecer a homeostase, extinguindo a hemorragia e aumentando volemia e pressão arterial. No local da hemorragia, a cascata de coagulação se inicia e plaquetas são ativadas, com o objetivo de se criar o tampão hemostático primário e cessar a perda de sangue (HOFFMAN; CICHON, 2013). Por outro lado, fatores fibrinolíticos começam a atuar sistemicamente, com o objetivo de impedir a formação de coágulos em outras regiões (CHANG et al., 2016). Entretanto, o excesso desses processos inibidores da coagulação resulta numa controversa resposta compensatória patológica de supressão da fibrinólise e coagulopatia profunda (BROWN et al., 2011; SPANN et al., 2016; WOHLAUER et al., 2012).

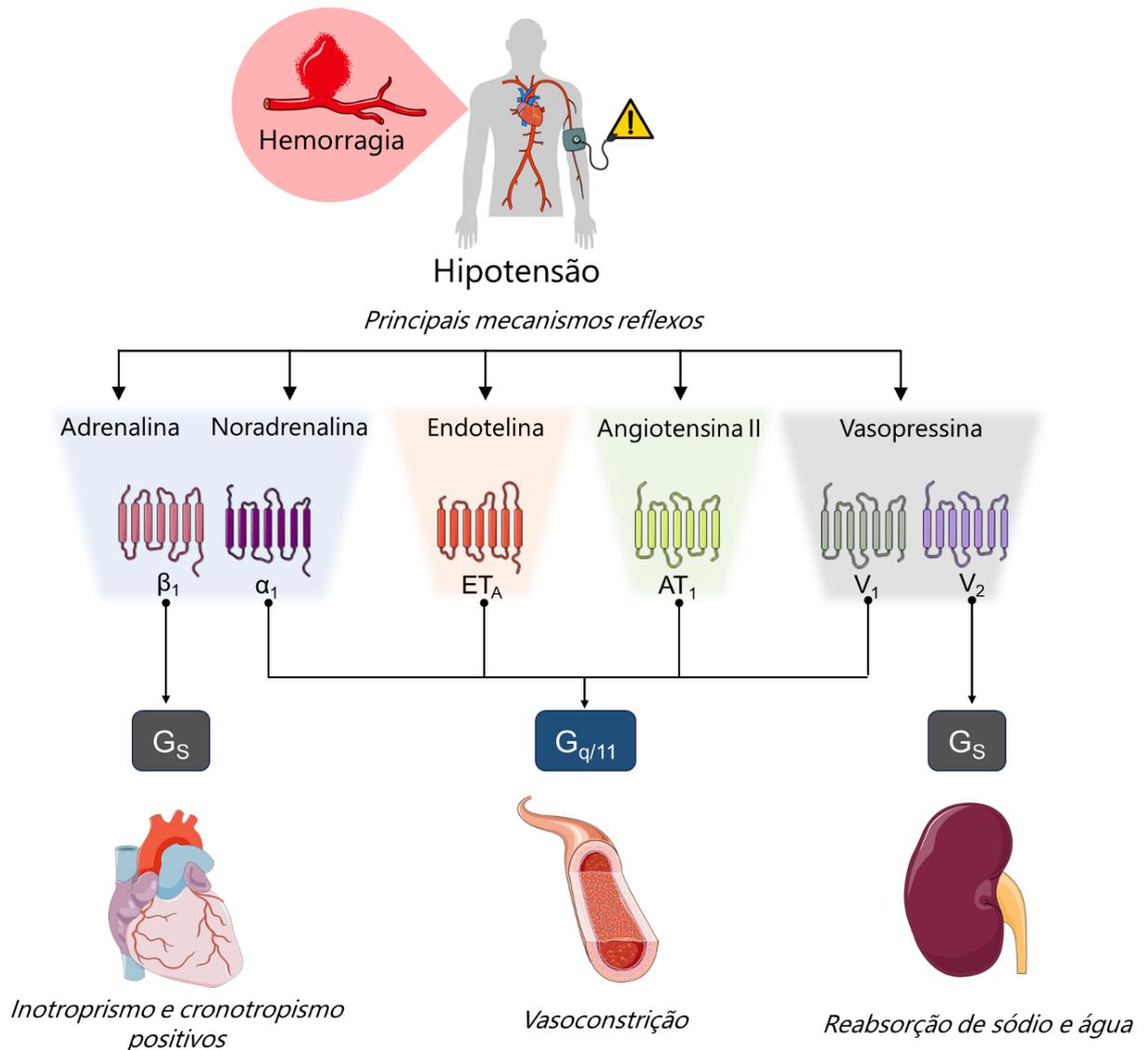
Do ponto de vista cardiovascular, a hemorragia ativa mecanismos neuroendócrinos reflexos com o objetivo de aumentar a pressão arterial. A redução do DC e da RVP ativam a liberação de vasoconstritores endógenos como a noradrenalina, adrenalina, endotelina-1, angiotensina II e vasopressina (BOND; JOHNSON, 1984, 1985; CHANG, 1992; JAKSCHIK et al., 1974; YILMAZ et al., 2003). Essa fase, na qual o organismo consegue manter um tônus vascular para tentar aumentar a pressão arterial para níveis aceitáveis, é conhecida como fase compensatória.

Entre outras ações, esses mediadores agirão principalmente nos sistemas cardiovascular e renal para aumentar frequência cardíaca (FC) e tônus vascular. A adrenalina e noradrenalina vão agir tanto em receptores acoplados à proteína G (GPCRs) de tipo  $\beta_1$  cardíacos quanto em receptores  $\alpha_1$  presentes na musculatura lisa vascular. Já a endotelina-1 e angiotensina II vão ter suas principais ações mediadas por receptores  $ET_A$  e  $AT_1$  das arteríolas, respectivamente. A vasopressina irá se ligar a receptores  $V_1$  presentes na musculatura lisa vascular e  $V_2$  expresso nos rins. A ação da adrenalina e noradrenalina nos receptores  $\beta_1$  cardíacos é mediada pela proteína  $G_s$ , que tem como sistema efetor a estimulação da ciclase de adenilil (AC). A ativação da AC leva ao aumento dos níveis intracelulares do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), que ativa a proteína cinase A (PKA). A PKA fosforila diferentes alvos no coração, culminando com efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos (BAKER, 2010; BAKER et al., 2017). Os receptores  $\alpha_1$ ,  $ET_A$ ,  $AT_1$  e  $V_1$  possuem como principal via de

transdução de sinal a via da proteína  $G_{q/11}$ , que ativa a fosfolipase C (PLC). A ativação da fosfolipase C induz o aumento das concentrações citosólicas de cálcio que irá, juntamente com o diacilglicerol, ativar a proteína cinase C (PKC). A PKC irá fosforilar diferentes alvos e, como efeito final, acontece a contração da célula muscular lisa das arteríolas (DE GASPARO et al., 2000; METHVEN et al., 2009; METHVEN; SIMPSON; MCGRATH, 2009; THORIN; WEBB, 2010). Já as ações da vasopressina em receptores renais  $V_2$ , acoplados à proteína  $G_s$ , têm como principal finalidade a reabsorção de sódio e água, na tentativa de reestabelecer a volemia (BICHET et al., 2023). Os principais mecanismos reflexos que atuam sobre os sistemas cardiovascular e renal são apresentados na figura 1.

Entretanto, resposta aos vasoconstritores endógenos é uma vasoconstrição que, apesar de ter o objetivo de aumentar a pressão arterial para garantir valores minimamente satisfatórios, pode ter como consequência uma piora na perfusão tecidual, graças ao efeito destes agentes na microcirculação, piorando o processo de danos às células (HUTCHINGS et al., 2018).

Figura 1 – Principais mecanismos reflexos que atuam nos sistemas cardiovascular e renal ativados durante o choque hemorrágico



Após uma hemorragia, a redução do volume sanguíneo ativa mecanismos neuroendócrinos reflexos que levam à produção de mediadores como a adrenalina, noradrenalina, endotelina, angiotensina II e vasopressina com o objetivo de aumentar a pressão sanguínea. São apresentados na figura os receptores aos quais esses mediadores se ligam, o órgão onde eles estão expressos, o tipo de proteína G ativada e o efeito final de suas ativações.

Fonte: Elaborado pelo autor. Imagens obtidas do banco de imagens da ELSEVIER Medical Art®

### 2.1.2.3 *Descompensação pós-choque hemorrágico*

Os danos que ocorrem durante a fase compensatória são, na grande maioria, reversíveis. Entretanto, se a hemorragia não for controlada, instala-se uma situação em que os mecanismos reflexos se exaurem, chamada de fase de descompensação. A maioria dos graves danos induzidos aos órgãos pelo CH acontecem durante esta fase (KUO; PALMER, 2022).

Na fase de descompensação acontece uma vasodilatação progressiva e, como consequência, uma redução da RVP, mesmo com o aumento da produção e liberação de vasoconstritores. Apesar de ter sido primeiramente relacionada ao choque séptico, essa vasoplegia acontece em todos os tipos de choque (LEVY et al., 2018). Ela se caracteriza por hipo-reatividade aos vasoconstritores incluindo adrenalina (KOVÀCH; TAKÀCS, 1953; MANGER et al., 1957), noradrenalina (CATCHPOLE; HACKEL; SIMEONE, 1955; MELLANDER; LEWIS, 1963), angiotensina II (MIDDLETON, 1944) e outros. Os mecanismos envolvidos nessa vasoplegia são complexos, envolvendo dessensibilização de GPCRs e produção aumentada de óxido nítrico (LEVY et al., 2018).

Os GPCRs, que são os principais tipos de receptores envolvidos na regulação do tônus vascular, são peças importantes da vasoplegia induzida por estados de choque. Quando ativos, estes receptores são fosforilados em sítios específicos por cinases de receptores acoplados à proteína G (GRK). A fosforilação do receptor impede sua interação com a proteína G e promove sua internalização em vesículas. Como os mecanismos reflexos ativados após o choque induzem liberação maciça de vasoativos, com o passar do tempo, a internalização de receptores mediada por GRK aumenta, diminuindo a densidade dos receptores na membrana celular (COHN et al., 2008; RIBAS et al., 2007).

Além do processo de dessensibilização, a expressão da sintase de óxido nítrico é aumentada durante o choque e a produção de óxido nítrico aumenta (THIEMERMANN et al., 1993). O óxido nítrico ativa a ciclase de guanilil solúvel, que converte trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Este segundo mensageiro ativa a proteína cinase G (PKG). Outras moléculas vasodilatadoras também entram em ação, como a prostaciclina produzida pela enzima ciclo-oxigenase 2 (MÓZES; WIESZT, 1989). A prostaciclina atua em receptores IP, que são acoplados à proteína G<sub>s</sub>, ativando a via da AC. Tanto a PKG quanto a PKA,

em músculo liso vascular, irão fosforilar diferentes alvos produzindo o relaxamento da célula muscular lisa das arteríolas e levando à vasodilatação (BEUVE et al., 2023; CLAPP et al., 2023).

#### 2.1.2.4 *Dano de reperfusão*

Para impedir a cascata de danos causados pela isquemia no CH, é necessário garantir a reperfusão do tecido. Normalmente, essa reperfusão é obtida através da infusão de fluidos e hemocomponentes. Entretanto, apesar da reoxigenação ser mandatória para o reestabelecimento da homeostase celular, a reperfusão de tecidos isquêmicos culmina com o aumento do dano tecidual. Este processo é conhecido como dano de isquemia-reperfusão (COLLARD; GELMAN, 2001).

Um estudo mostrou que a lesão por isquemia-reperfusão é mais grave que apenas a isquemia. A lesão da mucosa intestinal de parkss submetidos a 3 horas de isquemia seguida por uma hora de reperfusão foi significativamente maior do que a lesão encontradas em animais submetidos a 4 horas de isquemia apenas (PARKS; GRANGER, 1986). Esse dano é atribuído principalmente à reoxigenação e ao reestabelecimento do pH que, apesar de serem benéficos, aumentam o estresse oxidativo tecidual.

A reperfusão do tecido resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicais hidroxilas ( $OH^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peroxinitrito derivado da produção de óxido nítrico ( $ONOO^{\cdot}$ ) (COLLARD; GELMAN, 2001). As ERO são potentes agentes oxidantes que causam danos diretamente à membrana das células por um processo conhecido como lipoperoxidação (YIN; XU; PORTER, 2011). Além disso, as ERO estimulam a migração leucocitária e quimiotaxia, ativando a via da fosfolipase  $A_2$  e produzindo diferente prostanoídes, piorando a inflamação nos tecidos (PANÉS; PERRY; GRANGER, 1999).

Outro fator importante que é consequência do processo de isquemia-reperfusão é o estresse do retículo endoplasmático (OBERT; WOLPERT; KORFF, 2019). Este processo é conhecido como uma sobrecarga do retículo endoplasmático com proteínas com alterações conformacionais patológicas (JIAN et al., 2008; WOLPERT et al., 2018). Esta sobrecarga envia sinais bioquímicos para a redução da síntese proteica nas células. Se o dano não for cessado e a redução da síntese

proteica for insuficiente para reestabelecer a homeostase celular, o estresse do retículo endoplasmático prolongado pode resultar em morte celular (ZINSZNER et al., 1998).

O desbalanço metabólico afeta diretamente o controle ácido/base da célula e o reestabelecimento deste controle deve acontecer antes que a célula retorne às condições normais de funcionamento. Por causa da isquemia, o ambiente celular se torna acidótico, como detalhado anteriormente. A reversão repentina dessa acidose durante a reperfusão parece ser maléfica para as células (LAMANNA, 1996). Desta forma, a manutenção do pH ligeiramente baixo parece ser benéfico para que as células retornem à função regular mais rapidamente (CURRIN et al., 1991). Este fenômeno é conhecido como “paradoxo do pH” e é mais um mecanismo do dano por isquemia-reperfusão.

### **2.1.3 Disfunção orgânica associada ao choque hemorrágico**

As manifestações clínicas da lesão de isquemia-reperfusão induzidas pelo CH variam desde arritmias até a falência de múltiplos órgãos. Existem vários escores clínicos que têm como objetivo avaliar a gravidade e diagnosticar pacientes com disfunções orgânicas de diferentes origens (ANTONELLI et al., 1999; REITER et al., 2004; VOGEL et al., 2014).

Embora existam diferentes sistemas de escores, todos têm como objetivo a avaliação dos sistemas do organismo. Para isso, são atribuídas diferentes pontuações com base em dados clínicos e laboratoriais, abrangendo sistemas como o respiratório, cardiovascular, hepático, neurológico e renal, entre outros. A presença do dano ou disfunção em dois desses sistemas, conforme indicado pela pontuação atribuída, define a falência orgânica (FRÖHLICH et al., 2014).

Pacientes de CH que desenvolvem falência de múltiplos órgãos podem apresentar sintomas como hipotensão, dificuldade respiratória e baixa saturação de oxigênio, disfunção hepática e da coagulação, alteração do estado mental e alterações metabólicas com elevação de níveis de lactato, lesão renal aguda, distúrbios eletrolíticos e acidose metabólica (HUTCHINGS et al., 2017). À medida que mais sistemas são afetados, o prognóstico do paciente piora, e este prognóstico pode ser avaliado a partir dos escores.

Um estudo realizado em um centro de trauma no Reino Unido, entre os anos de 2003 e 2011, analisou 491 pacientes com disfunção de múltiplos órgãos causada por trauma e admitidos na unidade de terapia intensiva. Este estudo analisou três escores diferentes: *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), Marshall e Denver (HUTCHINGS et al., 2017). Os resultados deste estudo mostram que não houve diferenças significativas na duração da falência de múltiplos órgãos diagnosticada através dos três métodos. No entanto, foi possível observar que os sistemas mais afetados (em número de pacientes) são o respiratório e hepático, de acordo com os escores Denver e SOFA. Na avaliação pelo escore Marshall, o sistema cardiovascular foi o mais afetado. Também é importante destacar que, tanto na escala SOFA quanto na escala Denver, o sistema renal foi o menos afetado. Portanto, em pacientes que desenvolvem falência de múltiplos órgãos após o trauma, o sistema renal é um dos sistemas mais resistentes, não apresentando alterações em seus marcadores de função mesmo quando outros sistemas estão comprometidos.

#### **2.1.4 Tratamentos do choque hemorrágico e da falência orgânica**

É crucial iniciar o tratamento imediato para estabilizar o paciente após o CH e tratar as causas subjacentes. No caso do CH e da disfunção de múltiplos órgãos induzida por ele, um protocolo ideal ainda não foi estabelecido. Entretanto, o controle rápido da hemorragia, reestabelecimento do volume intravascular e terapias de suporte são fundamentais para a minimização dos danos (GUTIERREZ; REINES; WULF-GUTIERREZ, 2004).

Em pacientes graves, a utilização de hemoderivados como o concentrado de hemácias, plasma fresco congelado e concentrado de plaquetas (1:1:1) tem sido mais indicada do que a utilização de fluidos cristaloides (como soro fisiológico e Ringer lactato) (CHIPMAN et al., 2020). Entretanto, apesar de controversa, a utilização de cristaloides ainda pode ser indicada em certas situações (DEEB et al., 2023). Além disso, os pacientes parecem se beneficiar da “hipotensão permissiva”. Neste caso, a meta da pressão sistólica durante a reperfusão é em torno de 90 mmHg ao invés de valores mais elevados e considerados normais (TRAN et al., 2018).

Em relação a terapias medicamentosas, não existem medicamentos na terapêutica que tenham aplicação direta no CH ou na disfunção de órgãos. Os

fármacos empregados nestas situações visam um tratamento de suporte, para que o paciente consiga ter tempo de se recuperar. Um exemplo de terapia empregada com esta finalidade é a utilização de agentes hemostáticos, como o ácido tranexâmico, que é indicado para a prevenção de hemorragias secundárias por hiperfibrinólise (NAPOLITANO et al., 2013). Por outro lado, apesar de serem utilizados em outros tipos de choque, o uso de vasopressores parece aumentar a mortalidade em pacientes de CH se forem administrados, sobretudo, nas primeiras 24 horas (AOKI et al., 2018).

## **2.1.5 Pesquisa básica e translacional em choque hemorrágico**

### *2.1.5.1 Modelos animais de choque hemorrágico*

Protocolos experimentais de CH têm sido utilizados há muitos anos e o contínuo interesse em torno dessa condição levou a uma ampla variedade de métodos. Um artigo de revisão destacou que essa falta de consistência impacta a comparabilidade dos estudos (TREMOLÉDA et al., 2017), dificultando o progresso nessa área de pesquisa. Por exemplo, não há consenso em relação a variáveis fundamentais, como a meta desejada de pressão sanguínea durante o choque, a duração do período de hemorragia ou a escolha dos anestésicos.

A utilização de protocolos de CH para pesquisa tem dois principais objetivos: (1) testar terapias em potencial em modelos pré-clínicos e (2) investigar os mecanismos fisiopatológicos desta condição. Animais de grande porte são utilizados principalmente em pesquisa pré-clínica de potenciais terapias ao passo que animais de pequeno porte são utilizados na ciência básica, para a avaliação e descoberta dos mecanismos patogênicos envolvidos no CH (MAJDE, 2003).

Em roedores, existem três principais tipos de protocolos de CH: hemorragia de volume fixo, hemorragia de pressão fixa e hemorragia não controlada. Modelos de hemorragia não controlada, como laceração hepática ou amputação caudal, são sempre terminais, tornando impossível avaliações tardias. Modelos que usam o volume fixo predeterminam uma porcentagem do volume total de sangue, que é calculado com base no peso do animal. Neste caso, o grau da hipotensão induzida não é predeterminado, tornando a reprodutibilidade mais difícil de ser alcançada

(GAINER; LIPA; FICENEC, 1995). Já nos modelos de pressão fixa, o sangue dos animais é retirado até que a pressão arterial atinja um valor específico, que é mantido por retiradas adicionais ou reinfusão do sangue, quando necessário. Este protocolo é mais fácil de ser padronizado e é mais reprodutível, fazendo com que essa abordagem seja mais confiável que protocolos por hemorragia não controlada ou volume fixo (FÜLÖP et al., 2013). Um levantamento de alguns estudos que utilizam o modelo de pressão fixa foi realizado no quadro 1, onde podem ser observadas as principais características de cada estudo.

Quadro 1 – Parâmetros retirados de estudos publicados que realizaram o protocolo de choque hemorrágico com pressão fixa e análises não-agudas

Anestésicos	PAM (mmHg)	Duração (minutos)	Reposição de fluido (para grupo controle)	Tempo de análise	Medida utilizada	Referência
Ketamina e xilazina (60 e 10 mg/kg, i.p.) Manutenção: Isoflurano (1 - 2%)	30	60	Sangue retirado + RL (mesmo volume do sangue)	48 e 72 h	Parâmetros hemodinâmicos, creatinina, lactato, MPO	(DUNBERRY-POISSANT et al., 2018)
Isoflurano (2% - 5%)	38-40	30	1 mL de Hextend® + sangue retirado	30 dias	Prejuízo neuromotor e sobrevivencial	(PROCTOR et al., 2015)
Pentobarbital (30 mg/kg, i.p.)	40	180	Apenas RL (2x o volume do sangue retirado)	1, 2 e 24 h	AST, ALT, creatinina, ureia, sobrevivência	(LEI et al., 2015)
Uretano (13.3%) i Cloralose (0.5%)	30	90	Sangue retirado	12 h	Apoptose neuronal	(LIN et al., 2020)
Isoflurano	40	90	Apenas RL (4x o volume do sangue retirado)	24 h	AST, ALT, MPO e citocinas tissulares	(LIU; LIU; YU, 2011)
Isoflurano	40	90	Apenas RL (mesmo volume do sangue retirado)	4 h e 12 dias	AST, ALT, creatinina, lactato, citocinas e sobrevivência	(WU et al., 2008)
Pentobarbital (35 mg/kg, i.p.)	40	60 or 90	Sangue retirado	1 ou 3 dias	Produção e composição de urina e histologia renal	(KREISBERG et al., 1976)
Sevoflurane (3 - 8%)	30-40	60	Sangue retirado + Salina (se necessária para manter a pressão no nível basal)	6, 12, 24 h e 30 dias	Análises mitocondriais, produção de ERO, apoptose neuronal e aprendizado	(ZHANG et al., 2019)
Pentobarbital (50 mg/kg, i.p.)	30	14	Sangue retirado	24 h	Gasometria arterial, lactato e sobrevivência	(MANN et al., 1997)

Fonte: elaborado pelo autor

ALT: alanina transaminase; AST: aspartato transaminase; DAO: diamide oxidase; LDH: lactato desidrogenase; MPO: mieloperoxidase; PAM: pressão arterial média; RL: ringer lactato; ERO: espécies reativas de oxigênio.

Evidentemente, os três modelos citados apresentam limitações. Num ambiente de pesquisa básica, os animais apresentam boa condição de saúde e ausência de comorbidades, o que nem sempre é visto no cenário clínico. Além disso,

existe a necessidade de utilizar anestesia e antiagregantes plaquetário no protocolo experimental, e estes fatores podem ter influência direta nos resultados observados (DAI et al., 2020; RANA et al., 1992). Por estas razões, por mais que os modelos animais sejam de extrema importância para a medicina, cautela é necessária ao transpor os resultados da pesquisa básica.

#### 2.1.5.2 Modelos *in vitro* de lesão de hipóxia-reoxigenação

Modelos *in vitro* de lesão por isquemia-reperfusão também são empregados na pesquisa sobre CH e recebem comumente a denominação de modelos de hipóxia-reoxigenação (SAIKUMAR et al., 1998). Embora esses modelos não reproduzam a complexidade de uma condição sistêmica de CH, eles permitem uma avaliação mais simplificada e direta dos efeitos da hipóxia e da reoxigenação sobre diferentes tipos celulares. Além disso, a simplicidade dos métodos viabiliza a realização de alterações genéticas e a utilização de ferramentas farmacológicas em um contexto mais preditivo da fisiopatologia dessa condição (CHEN; VUNJAK-NOVAKOVIC, 2018).

Os modelos *in vitro* de hipóxia-reoxigenação precisam simular aspectos do ambiente celular que acontecem durante o dano de isquemia-reperfusão. Portanto, além de promover a redução da oferta de oxigênio para as células, é também preciso simular fatores incluindo o desbalanço iônico, acidose, acúmulo de metabólitos tóxicos e privação nutricional (KALOGERIS et al., 2012).

É possível atingir um ambiente com limitação na oferta de oxigênio através da adição de uma camada de óleo mineral acima da solução fisiológica em que as células se encontram. Desta maneira, a isquemia é atingida gradativamente, com redução dos níveis de nutrientes e acúmulo dos metabólitos celulares. Entretanto, é um método menos reprodutível, com possibilidade de causar danos extras às células (CHEN; VUNJAK-NOVAKOVIC, 2018; STRIJDOM; GENADE; LOCHNER, 2004).

Os modelos que melhor atingem as metas desejadas de hipóxia-reperfusão combinam a manipulação das soluções fisiológicas com a diminuição na oferta de oxigênio. Para isso, é possível incubar células em soluções fisiológicas sem glicose e coloca-las em câmaras especializadas que trocam o ar atmosférico contido em seu interior por uma mistura gasosa de composição conhecida. É possível utilizar uma mistura totalmente livre de oxigênio, mas também é possível fazer graduações nos níveis de oxigênio. Alguns autores defendem que a hipóxia ( $O_2 < 1,5\%$ ) seria um

modelo mais consistente com a realidade do que a anóxia (ausência completa de O<sub>2</sub>) e que algumas vias bioquímicas mediadas por dano mitocondrial só se ativam em condições de hipóxia e não de anóxia (SCHROEDL et al., 2002; SCHUMACKER, 2002).

Entretanto, além da hipóxia, que simula o dano de isquemia, é necessário simular o dano de reperfusão. No cenário *in vivo*, a reperfusão é atingida pela reestabelecimento do aporte de oxigênio e nutrientes aos tecidos afetados, além da remoção dos produtos metabólicos acumulados. Nos modelos *in vitro*, este processo é atingido pela reintrodução das células ao ar atmosférico (pela retirada da camada de óleo ou retirada das células de dentro da câmara) e pela substituição da solução fisiológica por um meio completo de nutrientes (normalmente, o que estava incubando as células anteriormente ao protocolo começar) (FREYER; HARMS, 2017; MENG; LIU; WANG, 2015; TASCA; DAL-CIM; CIMAROSTI, 2015).

## 2.2 SUMOILAÇÃO DE PROTEÍNAS

O processo conhecido como SUMOilação refere-se à conjugação reversível de proteínas SUMO a resíduos de lisina em proteínas alvo. Esse fenômeno ocorre por meio de uma via enzimática de três etapas (CHANG; YEH, 2020), resultando na modificação da localização, estabilidade e atividade das proteínas, bem como na alteração da expressão gênica, reparo de DNA e processamento de RNA (FLOTTHO; MELCHIOR, 2013).

No geral, a SUMOilação de proteínas é aumentada em resposta a uma variedade de estímulos (GUO; HENLEY, 2014). Em especial, quando submetidas ao choque térmico, as células ativam intensamente vias de sinalização que levam à expressão de proteínas do choque térmico (HSP, do inglês *heat shock proteins*) (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010), que são altamente controladas por proteínas SUMO (ANCKAR et al., 2006; KMIECIK et al., 2021; SEIFERT et al., 2015). A SUMOilação também tem um papel importante na resposta a outras condições de estresse, como infecções (DOMINGUES et al., 2015), estresse osmótico e oxidativo (FOLZ et al., 2019). Portanto, considera-se a SUMOilação como uma importante modificação pós-traducional relacionada com respostas celulares ao estresse. Os próximos tópicos abordarão essa relação.

## 2.2.1 Definição e características da SUMOilação

### 2.2.1.1 A descoberta da SUMOilação

A descoberta da SUMOilação enquanto modificação pós-traducional se deu em meados dos anos 90. Inicialmente, mesmo não conhecendo sua identidade, foi descoberto o gene codificador de SUMO em fungos *Saccharomyces cerevisiae* durante uma investigação genética que tinha como objetivo estudar os genes envolvidos na transcrição de proteínas do centrômero (MELUH; KOSHLAND, 1995). A partir daí, foram realizados estudos que mostravam interações de proteínas codificadas por este gene a outras proteínas humanas, como a RAD51, RAD52, FAS e corpos nucleares de leucemia promielocítica (ou *PML nuclear bodies*) (BODDY et al., 1996; OKURA et al., 1996; SHEN et al., 1996). Cada um desses estudos nomeou a nova proteína descoberta diferentemente. Entretanto, todos faziam menção ao fato de que essa proteína era um análogo da ubiquitina, e que seu gene já havia sido encontrado anteriormente no *S. cerevisiae*. Por fim, foi descoberto que essa proteína se ligava covalentemente a RanGAP1, uma proteína ativadora de Ran GTPase. A ligação desta nova proteína semelhante à ubiquitina seria capaz de regular a localização subcelular da RanGAP1, determinando sua dinâmica entre o citosol, na sua forma não-SUMOilada, e o núcleo, na sua forma SUMOilada (MAHAJAN et al., 1997; MATUNIS; COUTAVAS; BLOBEL, 1996).

A descoberta da SUMOilação despertou um interesse crescente na caracterização das proteínas SUMO. Muitas proteínas-alvo foram identificadas, juntamente com as diferentes formas das proteínas SUMO. Além da conjugação covalente, também foram descobertas interações não-covalentes envolvendo as SUMO. Todos esses aspectos serão explorados em detalhes nas próximas seções.

### 2.2.1.2 Aspectos estruturais das proteínas SUMO

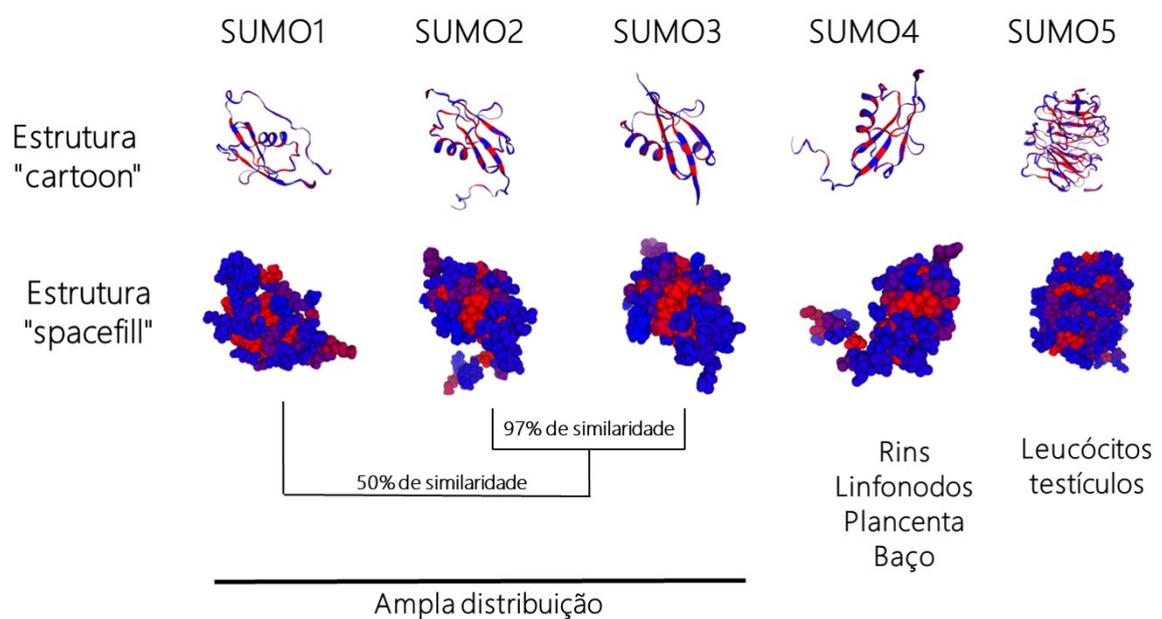
As proteínas SUMO foram nomeadas em razão de sua semelhança tridimensional e funcional com a ubiquitina. Entretanto, a ubiquitina compartilha menos de 20% da sequência de aminoácidos primária com as SUMO, além de ter distribuição de cargas diferente na sua superfície (BAYER et al., 1998; BERNIER-VILLAMOR et

al., 2002; MOSSESSOVA; LIMA, 2000). Até o momento, cinco isoformas (Fig. 2) de proteínas SUMO foram identificadas em mamíferos (SUMO1 – SUMO5), e elas possuem cerca de 100 aminoácidos, pesando entre 10 e 20 kDa (GUO et al., 2004; LIANG et al., 2016; MELCHIOR, 2000; SAITOH; HINCHEY, 2000).

As isoformas SUMO2 e SUMO3, amplamente expressas em diferentes tecidos, possuem uma similaridade na sequência primária de aminoácidos em torno de 97%. Interessantemente, a semelhança na estrutura primária não garante que suas estruturas tridimensionais sejam parecidas, como pode ser observado na Figura 2. Entretanto, essa alta similaridade da estrutura primária já faz com que seja impossível diferenciar SUMO2 e SUMO3 utilizando anticorpos comerciais, fazendo com que a comunidade científica se refira a esse par de proteínas como SUMO2/3 (SAITOH; HINCHEY, 2000).

Já a proteína SUMO1, também amplamente expressa em diferentes tecidos, apresenta uma similaridade primária em torno de 50% com o par SUMO2/3. Essa diferença é suficiente para que seja possível fazer a diferenciação entre SUMO1 e SUMO2/3 através da utilização de anticorpos comerciais. Portanto, as diferenças nas estruturas tridimensionais ficam ainda mais evidentes. Já as proteínas SUMO4 e SUMO5, apesar de já terem suas estruturas determinadas, são bem menos estudadas e apresentam poucos estudos que avaliam suas relevâncias biológicas. Já foi relatado expressão de SUMO4 é em linfonodos, placenta, baço e rins. A SUMO5 é encontrada em leucócitos do sangue periférico e testículos (GUO et al., 2004; LIANG et al., 2016)

Figura 2 – Estruturas tridimensionais das proteínas SUMO e suas distribuições



Fonte: Elaborado pelo autor. Fonte das estruturas: *Swiss model® repository*

## 2.2.2 Mecanismos e etapas da SUMOilação

### 2.2.2.1 Via bioquímica da SUMOilação

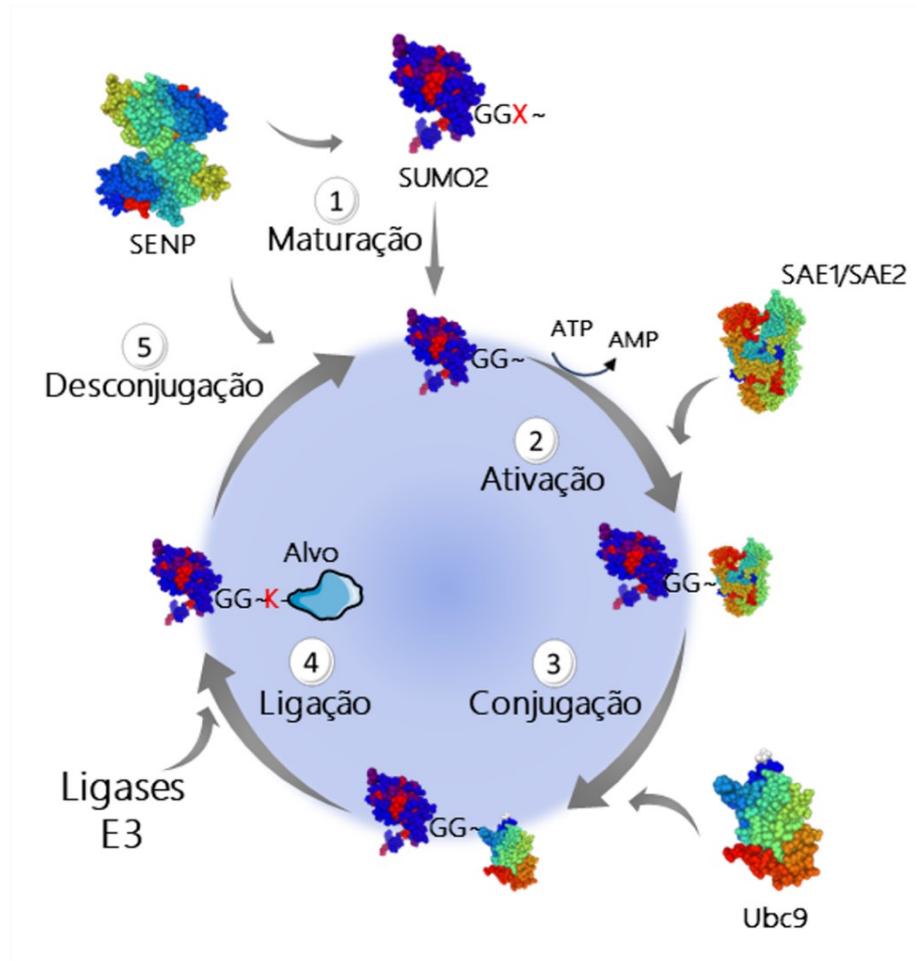
A conjugação da proteína SUMO é importante para modulação de vários alvos nucleares e não-nucleares (LUO et al., 2013; SILVEIRINHA; STEPHENS; CIMAROSTI, 2013; WASIK; FILIPEK, 2014), incluindo fatores de transcrição (GU et al., 2014; SALLAIS et al., 2017), canais iônicos (BENSON et al., 2007; BENSON; IÑIGUEZ-LLUHÍ; MARTENS, 2017; COELHO-SILVA; STEPHENS; CIMAROSTI, 2017) e transportadores (HU et al., 2017). Além da conjugação com SUMO através de ligação covalente, a interação não-covalente entre SUMO e proteínas alvo também pode ocorrer através de regiões específicas (GUPTA et al., 2020; JANSEN; VERTEGAAL, 2021; YANG et al., 2018).

No que diz respeito à ligação covalente, os substratos podem ser modificados tanto por uma única (monoSUMOilação) como por múltiplas SUMO (multi-SUMOilação), ou ainda uma cadeia de diversas SUMO (poli-SUMOilação) (WILKINSON; HENLEY, 2010). Dentre os requisitos para tornar uma proteína

SUMOilável, a proteína-alvo deve apresentar resíduos de lisina. Entretanto, apesar da única condição *sine qua non* para a SUMOilação acontecer ser a presença de uma lisina numa região da proteína que seja passível de ser SUMOilada, existe uma *motif* que, quando presente na proteína alvo, favorece a reação. A *motif* em questão é  $\psi$ -K-x-E, onde  $\psi$  é um aminoácido hidrofóbico (I, V, L, A, P ou M), K é uma lisina, x é um aminoácido qualquer, e E é o ácido glutâmico. Esta sequência específica coloca a lisina em questão num ambiente muito favorável para a ação da Ubc9, que é a única enzima conjugadora de SUMO conhecida (PICHLER et al., 2017).

A via de SUMOilação consiste nas etapas de maturação, ativação, conjugação e ligação (Fig. 3). Primeiramente, as proteases específicas da SUMO (SENP) 1, 2 ou 5 são responsáveis pela maturação, pois clivam o peptídeo SUMO para expor a diglicina na região carboxiterminal, que é essencial para a etapa de conjugação. Em seguida, o complexo SUMO E1 (enzima ativadora de SUMO 1 e 2 - SAE1/SAE2) ativa a SUMO de maneira dependente de ATP. Na terceira etapa, a proteína é conjugada por ação da Ubc9, a única enzima SUMO E2 conjugadora conhecida. Como resultado, as proteínas SUMO são capazes de se ligar a alvos. As proteínas E3, conhecidas como SUMO ligases (exemplos: as diferentes isoformas da proteína inibidora do transdutor de sinal e ativador da transcrição [PIAS], RanBP2, Topors), também podem participar da etapa de ligação; no entanto, elas não são obrigatórias para a reação (KUNZ; PILLER; MÜLLER, 2018; LIU et al., 2010; NAKAGAWA; YOKOSAWA, 2002; PICHLER et al., 2002; SAPETSCHNIG et al., 2002; WEGER; HAMMER; HEILBRONN, 2005).

Figura 3 – Via bioquímica de SUMOilação e deSUMOilação



1 - Enzimas SENPs (proteases específicas da SUMO) maturam a SUMO, expondo seu resíduo diglicina (GG). 2 - A SUMO é ativada pelo complexo SAE1/SAE2 (enzimas ativadoras da SUMOilação 1 e 2), consumindo ATP. 3 – A SUMO é conjugada a um alvo proteico pela enzima Ubc9. 4 - As ligases SUMO E3 podem participar da etapa de ligaçao, mas essa etapa não é obrigatória. 5 - A desconjugação também é realizada pelas SENPs.

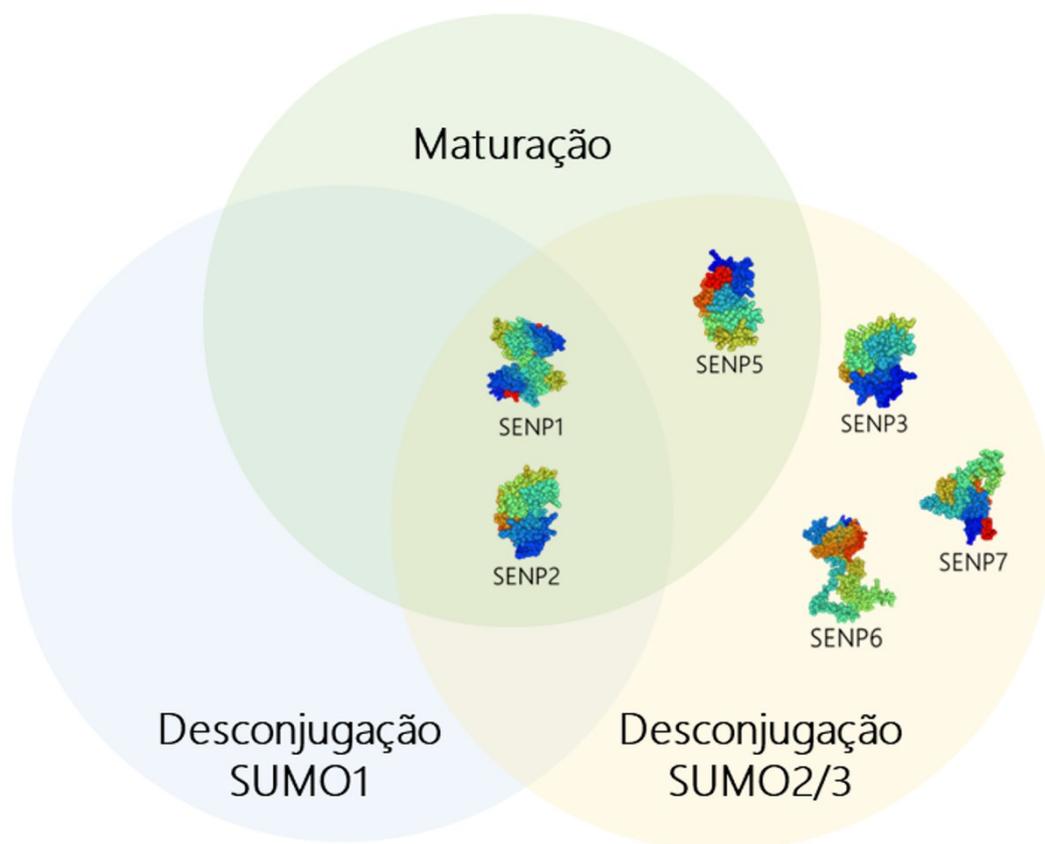
Fonte: Elaborado pelo autor. Fonte das estruturas: *Swiss model® repository*

#### 2.2.2.2 DeSUMOilação

Uma característica importante da SUMOilação é sua labilidade, sendo a etapa de deSUMOilação catalisada por todas as enzimas SENP conhecidas (SENP 1-3 e 5-7, Fig. 4). As enzimas SENP apresentam alta especificidade, sendo que algumas SENP catalizam apenas uma isoforma da proteína SUMO e outras SENP agem em diferentes proteínas SUMO.

Análises *in vitro* da atividade catalítica de diferentes SENP demonstraram que SENP1 e SENP2 atuam na catálise tanto em SUMO1 quanto SUMO2/3. Entretanto, SENP1 e SENP2 exercem suas atividades com afinidades diferentes, sendo que SENP2 é mais ativa sobre SUMO2, especificamente, quando comparado com SUMO1 e SUMO3. Já a SENP1 tem preferência por atuar em SUMO1. Já a SENP3 e a SENP5 parecem ter uma afinidade muito maior pela desconjugação de SUMO2/3. Por fim, SENP6 e SENP7, que são as isoformas mais diferentes do grupo, mostram uma preferência única por SUMO2/3, principalmente em relação à clivagem de caudas poliSUMO (GONG; YEH, 2006; KOLLI et al., 2010; KUNZ; PILLER; MÜLLER, 2018).

Figura 4 – Diferentes proteases específicas de SUMO e suas atividades de catálise nas fases de maturação e desconjugação



SENP1 e SENP2 participam da maturação e desconjugação tanto de SUMO1 quanto SUMO2/3. SENP5 participa da maturação e desconjugação apenas da SUMO2/3. SENP3, SENP6 e SENP7 participam apenas da desconjugação de SUMO2/3.

Fonte: Elaborado pelo autor. Fonte das estruturas: *Swiss model® repository*

O alto número de isoformas SENP pode implicar que a deSUMOilação é muito mais específica do que a própria SUMOilação, que só tem uma enzima conjugadora conhecida (CELEN; SAHIN, 2020). Além disso, o *splicing* alternativo de SENP pode determinar diferentes localizações subcelulares e diferentes seletividades para substratos para uma mesma SENP, o que hipoteticamente poderia explicar alguns efeitos biológicos divergentes quando as diferentes isoformas da mesma SENP são geneticamente moduladas (BAWA-KHALFE et al., 2012; JIANG; CHIU; HSU, 2011; NAYAK; MÜLLER, 2014; RAWLINGS et al., 2019).

### **2.2.3 A SUMOilação em isquemias**

No geral, a SUMOilação de proteínas aumenta em resposta a uma variedade de estímulos estressores (GUO; HENLEY, 2014). Em relação ao estresse induzido por isquemia, a maioria dos estudos tem enfoque no sistema nervoso central, principalmente em contextos de acidentes vasculares cerebrais isquêmicos (CIMAROSTI et al., 2012; DATWYLER et al., 2011; SILVEIRINHA; STEPHENS; CIMAROSTI, 2013; WILKINSON; NAKAMURA; HENLEY, 2010). A ideia original que postulou a SUMOilação como uma possível modificação pós-traducional com potencial neuroprotetor após isquemias foi fundamentada em observações feitas em animais hibernantes (LEE et al., 2007).

Durante a hibernação, os animais precisam sobreviver a períodos extensos em extremos fisiológicos incluindo queda brusca da temperatura (4 – 6 °C), consumo de oxigênio (em torno de 3% do consumo regular) e redução dramática da frequência cardíaca (3 – 10 bpm) (HAMPTON; NELSON; ANDREWS, 2010). Mesmo considerando que esta é uma situação fisiológica, ainda assim se assemelha a uma condição de isquemia, em que os tecidos são submetidos a níveis muito baixos de nutrientes e oxigênio. No estudo original que identificou o aumento marcante na SUMOilação em cérebros de animais hibernantes, também foi visto que os níveis de SUMOilação em outros órgãos estavam elevados (LEE et al., 2007).

A partir disso, muitos estudos na área de isquemia mostraram que os níveis das proteínas SUMO, em especial a SUMO2/3, são aumentados logo após a reperusão (BERNSTOCK et al., 2018). Este mecanismo pode estar relacionado com o controle de processos metabólicos que induzem a citoproteção que determinam sobrevida celular e estão, inclusive, relacionados com longevidade (AL-ATTAR;

STOREY, 2020). Portanto, é razoável especular que a SUMOilação possa ser positivamente modulada para fornecer proteção aos órgãos durante condições caracterizadas por baixa perfusão sanguínea, não apenas no sistema nervoso central, mas também em órgãos periféricos.

Existe um interesse crescente de estudos que avaliam o papel da SUMOilação periféricamente após lesões de isquemia-reperfusão. A quase totalidade destes estudos avaliam situações de isquemias focais e não existe um consenso sobre o papel da SUMOilação nestes contextos (OLIVEIRA et al., 2022). Em relação a isquemias cardíacas, enquanto alguns estudos mostram que a SUMOilação pode ter efeitos prejudiciais como arritmias e danos aos cardiomiócitos (PLANT et al., 2020; RAWLINGS et al., 2019), outros estudos indicam que a SUMOilação pode ser protetora, melhorando a dinâmica mitocondrial, a autofagia e reduzindo a inflamação após a isquemia cardíaca (BIAN et al., 2019; GAO et al., 2018; XIAO et al., 2020; XIE et al., 2018).

Entretanto, o papel da SUMOilação durante isquemias em outros sistemas ou modelos sistêmicos, como o CH, é ainda pouco explorado. De acordo com resultados do nosso grupo, os órgãos respondem de formas distintas ao insulto de isquemia-reperfusão, sendo que os rins se mostram mais resistentes a esse tipo de insulto que o fígado. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o envolvimento da SUMOilação da resiliência renal após dano por isquemia-reperfusão

### 3 OBJETIVO DO TRABALHO

Estabelecer um método de CH por pressão fixa em ratos e avaliar o perfil da SUMOilação tissular em órgãos de interesse, investigando se a SUMOilação é uma modificação pós-traducional protetora após o dano de isquemia-reperfusão induzido pelo CH.

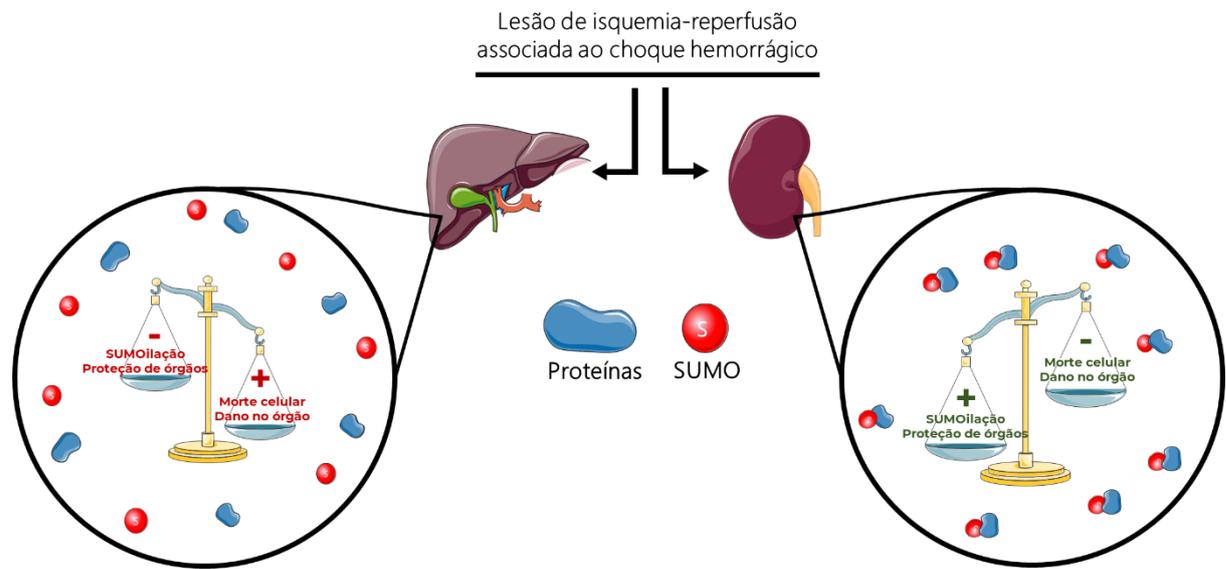
#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer parâmetros de pressão-alvo e tempo de CH
- Quantificar disfunção orgânica induzida pelo protocolo de CH
- Avaliar estresse oxidativo tissular
- Quantificar dano tecidual
- Avaliar ativação de proteínas de morte celular nos tecidos
- Estabelecer perfil de SUMOilação tissular, especificamente níveis totais e conjugados de SUMO1 e SUMO2/3
- Avaliar papel da SUMOilação da viabilidade celular de células renais de linhagem

#### 4 HIPÓTESE DO TRABALHO

Há aumento da SUMOilação de proteínas no tecido renal após o dano de isquemia-reperfusão causado pelo CH, ao passo que existe diminuição da SUMOilação hepática. O aumento da SUMOilação no rim é a causa da resiliência renal ao CH.

Figura 5 – Hipótese ilustrada do trabalho



Propõe-se que a SUMOilação total aumenta após o choque hemorrágico para conferir proteção celular. Alguns órgãos, como os rins, são mais eficientes em promover essa modificação pós-traducional quando comparado com outros e, assim, apresentam mecanismos de proteção mais eficientes contra o dano de isquemia-reperfusão.

Fonte: Elaborado pelo autor. Imagens obtidas do banco da ELSEVIER Medical Art®.

## 5 MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

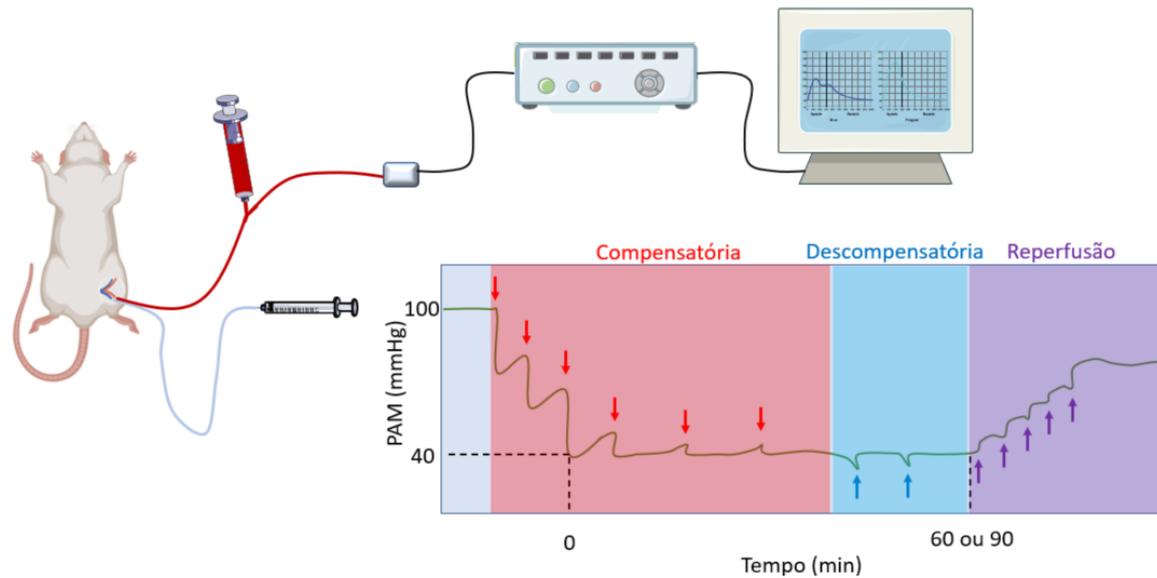
Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), pesando  $329 \pm 32,4$  g e com idade entre 2 e 3 meses, foram utilizados neste estudo. Os animais foram obtidos no biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no Brasil, e foram mantidos em uma sala com temperatura e iluminação controladas ( $23 \pm 2$  °C; ciclo de 12 horas claro/escuro), com acesso livre a água e comida. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade (número do protocolo: 73962502019, Anexo A) e estavam em conformidade com as diretrizes “*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*” (ARRIVE) (PERCIE DU SERT et al., 2020). Embora nenhum animal tenha sido sacrificado por esses motivos, os seguintes critérios humanitários foram considerados para este estudo: redução de peso igual ou superior a 20% em relação ao peso inicial, hipotermia (diferença de temperatura de 4 °C abaixo do grupo de controle), desidratação grave ou sempre que o experimentador julgou que o sofrimento animal era maior do que o esperado para o procedimento.

### 5.2 CHOQUE HEMORRÁGICO (CH)

O modelo de CH foi realizado de acordo com métodos previamente descritos com algumas modificações (SORDI et al., 2015, 2016) e está esquematizado na Figura 6. Antes do procedimento, os animais recebiam analgesia (tramadol, 10 mg/kg, i.p.) e anestesia (cetamina/xilazina, 100/10 mg/kg, i.m.). A artéria e a veia femorais esquerdas eram canuladas com tubos de polietileno (PE25; Smiths Medical International Ltd, Kent, Reino Unido). Durante o procedimento, a temperatura corporal era monitorada usando um termômetro auricular ( $37 \pm 0,5$  °C) e controlada por uma manta de aquecimento. A cânula arterial foi utilizada tanto para registrar a pressão arterial como para retirar sangue. A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram registradas por um transdutor acoplado a um PowerLab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Austrália) executando o *software* LabChart 8®. Após a estabilização da PAM, o sangue foi retirado a uma taxa de 1 mL/min até atingir a meta pressórica de  $40 \pm 2$  mmHg. O sangue retirado (em média  $9,86 \pm 3,9$  mL por

animal) era armazenado em geladeira e misturado com 0,2 mL de heparina (100 UI/mL) para evitar a formação de coágulos. A PAM foi mantida nos valores-alvo por meio de retirada adicional de sangue durante a fase compensatória ou administração do sangue previamente retirado pela veia femoral durante a fase descompensatória. Após 60 (CH 60) ou 90 minutos (CH 90), o sangue que havia sido retirado anteriormente era reinfundido em um período de 5 minutos, seguido da injeção de 1,5 mL/kg de solução de Ringer-lactato (i.v.). Para os experimentos que visavam o estabelecimento do protocolo experimental de CH, os animais foram eutanasiados 24 horas após o insulto (Quadro 1). Para a avaliação temporal, depois que padronização da cirurgia de CH estava estabelecida, os animais foram sacrificados 2, 6 ou 24 horas após a cirurgia (Quadro 2). Os animais do grupo que foi eutanasiado após 2 horas foram mantidos sob anestesia e canulados durante todo este período. Os animais eutanasiados 6 ou 24 horas após a ressuscitação tiveram suas cânulas removidas, os vasos ligados e a pele suturada, sendo deixados em gaiolas aquecidas para recuperação. Ratos falso-operados (sham) foram usados como controle e passaram por procedimentos cirúrgicos idênticos. Os animais sham recebiam o mesmo esquema analgésico/anestésico e 40 UI de heparina (i.v.), porém não eram submetidos à hemorragia e ressuscitação. No momento da eutanásia, os animais foram conectados novamente ao transdutor (recuperação de 2 horas via artéria femoral, recuperação de 6 e 24 horas via artéria carótida), e suas PAM e FC basal foram registradas. Sangue e órgãos (rim e fígado) foram coletados para análises posteriores

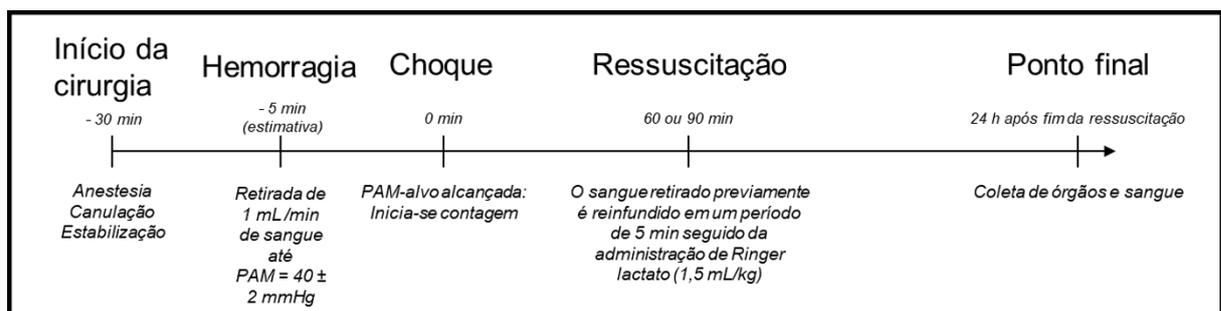
Figura 6 – Esquema do protocolo de choque hemorrágico



Procedimento de canulação da artéria e veia femoral de ratos anestesiados e submetidos à cirurgia de choque hemorrágico. O sangue era retirado através da cânula arterial. Além disso, através da cânula arterial, o animal era conectado a um transdutor que estava acoplado a um sistema de aquisição digital. As informações de valor de pressão arterial eram mostradas no monitor, e o procedimento de choque hemorrágico era iniciado como descrito anteriormente. A representação dos valores pressóricos de todas as fases do protocolo pode ser observada. Setas vermelhas indicam retiradas de sangue e setas azuis representam a reinfusão de sangue para a manutenção da pressão arterial em 40 mmHg. Setas roxas indicam a reinfusão do sangue durante a fase de reperusão.

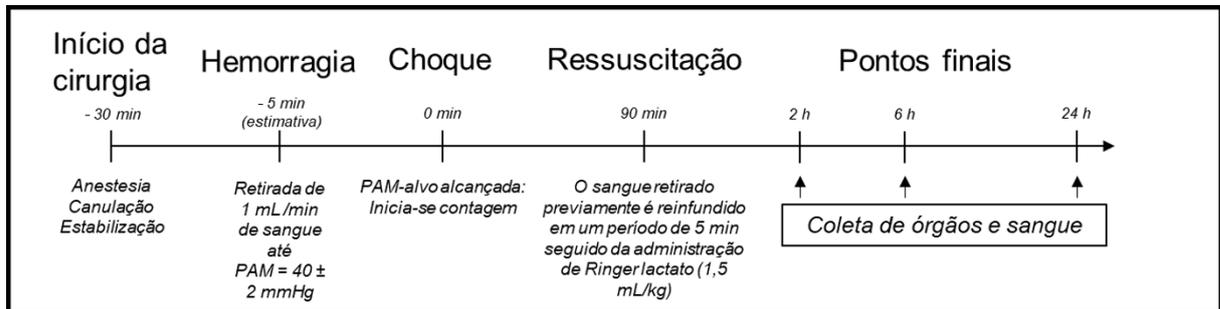
Fonte: Elaborado pelo autor. Imagens obtidas do banco da ELSEVIER Medical Art®.

Quadro 2 – Protocolo de choque hemorrágico utilizado para padronização do modelo



Fonte: elaborado pelo autor

Quadro 3 – Protocolo de choque hemorrágico utilizado para avaliação temporal da disfunção orgânica



Fonte: elaborado pelo autor

### 5.3 MARCADORES PLASMÁTICOS DE DANO E DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS

No momento da eutanásia, amostras de sangue dos animais foram coletadas em tubos contendo gel separador (Tubo Gel BD SST® II Advance®, Curitiba, Brasil). O sangue foi então centrifugado (2.200 g, 5 minutos) para obter o plasma, que foi transferido para um microtubo etiquetado com o código específico de cada animal e armazenado a -80 °C até a análise. As dosagens bioquímicas foram realizadas de maneira cega, sendo que o analista não estava ciente a qual grupo cada amostra pertencia. Creatinina, ureia, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) foram medidas de acordo com as instruções do fabricante (Siemens Healthineers, Erlangen, Alemanha).

### 5.4 DOSAGEM DE LACTATO

Nos experimentos de avaliação temporal, os níveis de lactato foram medidos utilizando um medidor de lactato (Accutrend Plus®; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). As medidas ocorreram logo antes da reperfusão e no momento da eutanásia (2, 6 ou 24 horas). O sangue foi coletado pela cânula arterial no momento da medição. O aumento nos níveis de lactato antes da reperfusão (Apêndice A) foi utilizado como um critério de inclusão para garantir que os animais submetidos a CH tivessem algum grau de dano orgânico até o final dos 90 minutos de choque (lactato > 2 mmol/L).

## 5.5 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Os rins e fígados foram coletados, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1,5 mL de PBS 10 mM (pH 7,4) contendo 1 mM de PMSF, seguido de centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi separado em tubos diferentes e armazenado a -80 °C para minimizar os efeitos de congelamento e descongelamento na atividade enzimática. O método de Bradford foi utilizado para a quantificação de proteínas.

### 5.5.1 Malondialdeído

A lipoperoxidação dos tecidos foi estimada determinando-se o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS*, do inglês *thiobarbituric acid reactive species*), sendo o malondialdeído (MDA) a principal delas (DRAPER; HADLEY, 1990). Aproximadamente 5 mg de proteína foram incubadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% para precipitar as proteínas. Após centrifugação (10.000 g, 15 minutos), os sobrenadantes foram coletados e reagiram com ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido aquecido para produzir uma base de Schiff rosa, que teve a absorvância medida em 532 nm usando um espectrofotômetro. Os níveis de TBARS foram expressos em nmol/mg de proteína.

### 5.5.2 Catalase

A atividade da catalase foi medida monitorando-se a diminuição da absorvância do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (AEBI, 1984). As amostras foram incubadas em tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) contendo 25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 °C. A taxa de degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medida a cada 30 segundos por um total de 5 minutos usando um espectrofotômetro UV/visível a 240 nm. A atividade enzimática foi calculada a partir da porção linear da curva e expressa como U/mg de proteína (1 U de catalase degrada 1 μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a 25 °C) utilizando o coeficiente de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm (43,6 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

### 5.5.3 Tióis livres (R-SH)

Resumidamente, uma alíquota de 50 a 100 µg de proteína foi diluída em PBS 10 mM (180 µL) mais tampão ácido bórico (35 µL) (100 mM de ácido bórico, 0,2 mM de EDTA, pH 8,5), e então 10 µL de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), 10 mM, foi adicionado e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. As amostras foram lidas em um espectrofotômetro a 412 nm (ELLMAN, 1959). Os resultados foram expressos como nmol R-SH/mg de proteína.

### 5.5.4 Glutathiona redutase (GR)

A atividade da GR foi determinada monitorando-se a diminuição da absorbância do NADPH (MANNERVIK, 1999). O sistema de incubação consistia em um tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0, 1 mM de EDTA, glutathiona oxidada (GSSG) e NADPH. A diminuição da absorbância a 340 nm foi monitorada com intervalos de 20 segundos durante um total de 2 minutos a 25 °C em um leitor de microplacas. A partir da parte linear da curva, a atividade enzimática foi calculada e expressa como nmol de NADPH consumido por minuto por mg de proteína (mU GR/mg de proteína), utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH a 340 nm (6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

### 5.5.5 Glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada medindo-se a taxa de oxidação do NADPH (WENDEL, 1981). O meio de incubação enzimática consistia em GSH, NADPH, glutathiona redutase (GR) e terc-butil-hidroperóxido em um tampão de reação (20 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7, 0 mM de EDTA e 0,8 mM de azida de sódio). A taxa de diminuição da absorbância a 340 nm foi monitorada ao longo de um período de 1 minuto, com intervalos de 10 segundos, em um leitor de microplacas. Foi selecionada a parte linear da cinética de decaimento, e a atividade da GPx foi expressa como mU/mg de proteína (1 U = 1 µmol de NADPH oxidado por minuto a 25 °C, pH 7), utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH a 340 nm (6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

## 5.6 DOT E WESTERN BLOTTING

As amostras de rim e fígado foram homogeneizadas em tampão de lise gelado (T-PER 78510, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, EUA) contendo inibidor de proteases adicionado no momento do preparo (Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e 20 mM de N-etilmaleimida (inibidor de SENPs). As amostras foram centrifugadas (10.000 g, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante coletado. A quantidade de proteína foi determinada utilizando o ensaio de proteína com ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Estados Unidos) ou reagente de Bradford (Bio-Rad, Hérculos, Estados Unidos). As amostras foram diluídas em tampão de azul (68,8 mM Tris-HCl, 26,3% de glicerol, 2,1% de SDS, 0,01% de Azul de Bromofenol; pH 6,8). Em seguida, as amostras foram desnaturadas por aquecimento (95 °C, 5 minutos) e 3 µg do extrato proteico foram diretamente adicionados a uma membrana de PVDF para análise por dot blotting, ou 88 µg foram utilizados em cada poço e separados eletroforéticamente em gel de poliacrilamida (NuPAGE™ 4 a 12%, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, Estados Unidos) e transferidos para uma membrana de PVDF para análise por *Western blotting*. As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos: SUMO1 (Cell Signaling Technology, 1:1000), SUMO2/3 (Cell Signaling Technology, 1:1000), Caspase-3 (Cell Signaling Technology, 1:1000), Caspase-8 (Alexis Biochemicals, 1:1000) e molécula de lesão renal 1 (KIM-1, do inglês *kidney injury molecule 1*, Thermofischer 1:1000). Para análise por *dot blotting*, anticorpos secundários de IgG de rato e coelho conjugados com peroxidase de rábano (HRP, Sigma, 1:10000) foram utilizados e as membranas foram coradas com ponceau para normalização. Para análise por *Western blotting*, os anticorpos primários foram incubados utilizando a solução ReadyTector® all-in-one (Candor, Wangen, Alemanha) e a β-actina foi utilizada para normalização (Cell Signaling Technology, 1:1000). Os imunocomplexos foram detectados usando um sistema de detecção de substrato quimiluminescente, Super Signal West Pico ou Super Signal West Femto Maximum (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). As membranas foram expostas ao sistema de fotodocumentação ChemiDoc MP, e as análises foram realizadas usando o software Image Lab™ (ambos da Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA). Os resultados foram expressos graficamente como uma porcentagem relativa ao grupo controle. Na análise de *Western blotting*, as bandas mais proeminentes foram selecionadas para serem quantificadas. As

membranas eram reutilizadas para mais uma incubação após passarem por tratamento para remoção dos anticorpos primários e secundários com *strip buffer* (1,5% glicina, 0,1% SDS, 1% [v/v] tween® 20, pH = 2,2).

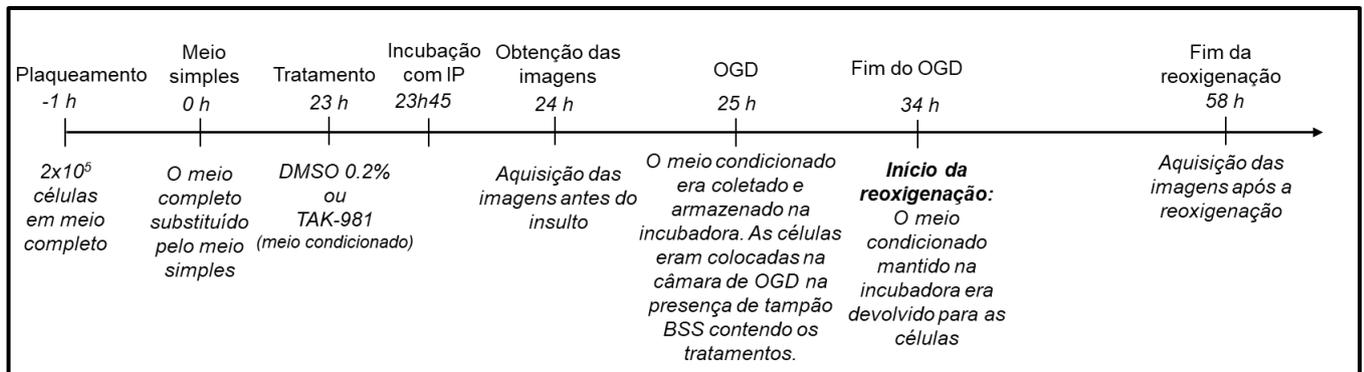
## 5.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os tecidos renais e hepáticos foram coletados, fixados com paraformaldeído a 4% por 24 a 48 horas, lavados com PBS e mantidos em álcool 70%. Em seguida, os tecidos foram processados e incluídos em parafina. As seções (5 µm) foram cortadas, coradas com hematoxilina-eosina (HE) e examinadas sob microscopia de luz (modelo DMI 3000B, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). O nível de dano renal foi pontuado com base no grau e extensão da lesão tubular, conforme descrito anteriormente (GUERCI et al., 2019). Os tecidos hepáticos foram avaliados com base nos graus de vacuolização, edema, infiltração leucocitária e dilatação sinusoidal, conforme descrito anteriormente (LEUNG et al., 2015). Dois investigadores independentes, sem conhecimento dos grupos experimentais, avaliaram de forma semiquantitativa a extensão do dano.

## 5.8 EXPERIMENTOS COM CULTURA DE CÉLULAS: *HUMAN KIDNEY-2* (HK-2)

Células epiteliais tubulares proximais de rim humano (HK-2, ATCC CRL-2190) foram obtidas da ATCC (Manassas, VA, EUA). As células foram cultivadas em meio completo (Meio de Eagle Modificado de Dulbecco/Mistura de Nutrientes F-12 Ham, DMEM/F-12, suplementado com 10% [v/v] de soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina-estreptomicina, glicose (concentração final de 5,5 mg/mL) e 0,05 mg/mL de extrato bovino de pituitária) a 37 °C em uma câmara umedecida com 5% de CO<sub>2</sub>. Um esquema detalhado dos procedimentos descritos abaixo é apresentado no Quadro 3.

Quadro 4 – Protocolo de privação de oxigênio e glicose seguido de reoxigenação em células HK-2



Fonte: Elaborado pelo autor

### 5.8.1 Privação de oxigênio e glicose

As células HK-2 foram submetidas à privação combinada de oxigênio e glicose (*oxygen and glucose deprivation*, OGD), conforme descrito anteriormente (HARMS et al., 2007). Brevemente, as culturas foram lavadas quatro vezes com uma solução salina balanceada (*balanced salt solution*, BSS [Composição em mM:  $\text{Na}^+$  143,8;  $\text{K}^+$  5,5;  $\text{Ca}^{2+}$  1,8;  $\text{Mg}^{2+}$  0,8;  $\text{Cl}^-$  125,3;  $\text{HCO}_3^-$  26,2;  $\text{H}_2\text{So}^{2-}$  1,0;  $\text{SO}_4^{2+}$  0,8; glicina 0,01 e pH 7.4]) e colocadas em uma câmara de privação de oxigênio 'IN VIVO2 300' (Ruskin, Pencoed, Reino Unido) com 5% de  $\text{CO}_2$ /0,3% de  $\text{O}_2$ , com um tampão livre de glicose, por 9 horas. Em seguida, as células foram retiradas da câmara de OGD, o tampão foi substituído pelo meio pré-condicionado (ver sessão 5.8.2) e as células foram novamente transferidas para a incubadora para a fase de reoxigenação de 24 horas.

Para os experimentos,  $2 \times 10^5$  células foram semeadas em 1 mL do meio completo em placas de 6 poços. Após uma hora, o meio foi substituído pelo meio simples para induzir a quiescência celular. Todos os experimentos foram realizados com células em estado quiescente. Células que passavam pelos passos de lavagem e incubação com BSS contendo 30 mM de glicose, e que não passavam por hipóxia, foram utilizadas como controle.

### **5.8.2 Tratamento com inibidor da enzima ativadora de SUMO 1 (SAE1)**

Em alguns experimentos, as células foram tratadas com TAK-981 (100  $\mu$ M), um inibidor da enzima ativadora do SUMO, ou com veículo (DMSO 0,2%), 1 hora antes do início das etapas de lavagem. O meio pré-condicionado, contendo o inibidor ou o veículo, foi mantido na incubadora durante o protocolo de OGD e foi adicionado de volta às culturas celulares durante a fase de reoxigenação. Além disso, os tratamentos também foram adicionados aos tampões utilizados durante o procedimento do OGD.

### **5.8.3 Transfecção viral**

Partículas lentivirais (LTV) foram geradas como descrito anteriormente (DATWYLER et al., 2011). Todos os construtos foram totalmente sequenciados antes da produção das partículas lentivirais. Os plasmídeos de transferência lentiviral foram co-transfectados com os plasmídeos de empacotamento psPAX2 (plasmídeo addgene 12260) e pMD2.G (plasmídeo addgene 12259, ambos fornecidos pelo Dr. Christoph Harms) em células 293TN (BioCat, Heidelberg, Alemanha) usando XtremeGene HP (Roche, Grenzach-Wyhlen, Alemanha) em OptiMEM (Gibco, Life Technologies, Karlsruhe, Alemanha). Duas coletas de sobrenadante contendo partículas virais do meio de cultura 293TN foram coletadas 48 e 72 horas após a transfecção. O sobrenadante foi centrifugado a 1790 g por 15 minutos e filtrado através de uma membrana de PVDF de ligação proteica baixa de 0,45  $\mu$ m (Millipore, Schwalbach, Alemanha). As partículas virais foram concentradas usando concentradores com corte molecular de peso 3 K (Filtros Amicon Ultra Centrifugal com 3 K, Millipore, Schwalbach, Alemanha) com 2380 g a 4 °C por 30 minutos e por ultracentrifugação por 2 horas a 4 °C (Optima MAX-XP, Tabletop Ultracentrífuga 113.700 g, Beckman Coulter, Krefeld, Alemanha), ressuspensos, aliqüotados em PBS e armazenados a -80 °C para uso posterior. A eficiência da transdução viral foi determinada a partir de diluições seriadas em culturas de células HK-2, usando fluorescência de proteína verde fluorescente (GFP) como um indicador 48 horas após a transdução. Esta etapa do trabalho foi desenvolvida nas dependências do Hospital Charité (Berlin, Alemanha).

#### 5.8.4 Ensaio de iodeto de propídeo (IP)

A viabilidade celular foi avaliada após a coloração das culturas de células com IP (concentração final de 6  $\mu\text{M}$ , 15 minutos antes da captura de imagens) para distinguir entre células vivas e mortas. Foram feitas três imagens por poço usando um microscópio invertido IX81 (Olympus, Hamburgo, Alemanha). A média do número total de células positivas para IP por poço foi calculada. O IP é uma corante fluorescente que penetra nas células com membranas comprometidas, indicando células mortas ou com membranas danificadas.

### 5.9 REAGENTES

A menos que indicado, todos os compostos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Company Ltd (Poole, Dorset, Reino Unido). A cetamina e a xilazina foram adquiridas da Ceva (Paulínia, SP, Brasil); a heparina da Blausiegel (Cotia, SP, Brasil); o tramadol da Teuto (Anápolis, GO, Brasil). Ringer-lactato foi comprado da Eurofarma (Ribeirão Preto, SP, Brasil). O DMEN/F:12 e o extrato bovino de pituitária foram da Thermo Fischer Scientific Inc (Rockford, Estados Unidos).

### 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como gráficos de pontos, e os valores de média  $\pm$  desvio padrão (DP) também são exibidos. A distribuição dos dados foi avaliada usando o teste de Shapiro-Wilk, enquanto o teste de Bartlett foi usado para verificar a homogeneidade das variâncias. Quando necessário, foi realizada uma transformação logarítmica para garantir a normalidade e homogeneidade das variâncias. Para análises paramétricas envolvendo três ou mais grupos, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) de um ou dois fatores, seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Dados não paramétricos foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Dunn. Para análises de correlação, foi utilizado o teste de Spearman. *Outliers* foram detectados e removidos usando o teste de Grubb. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

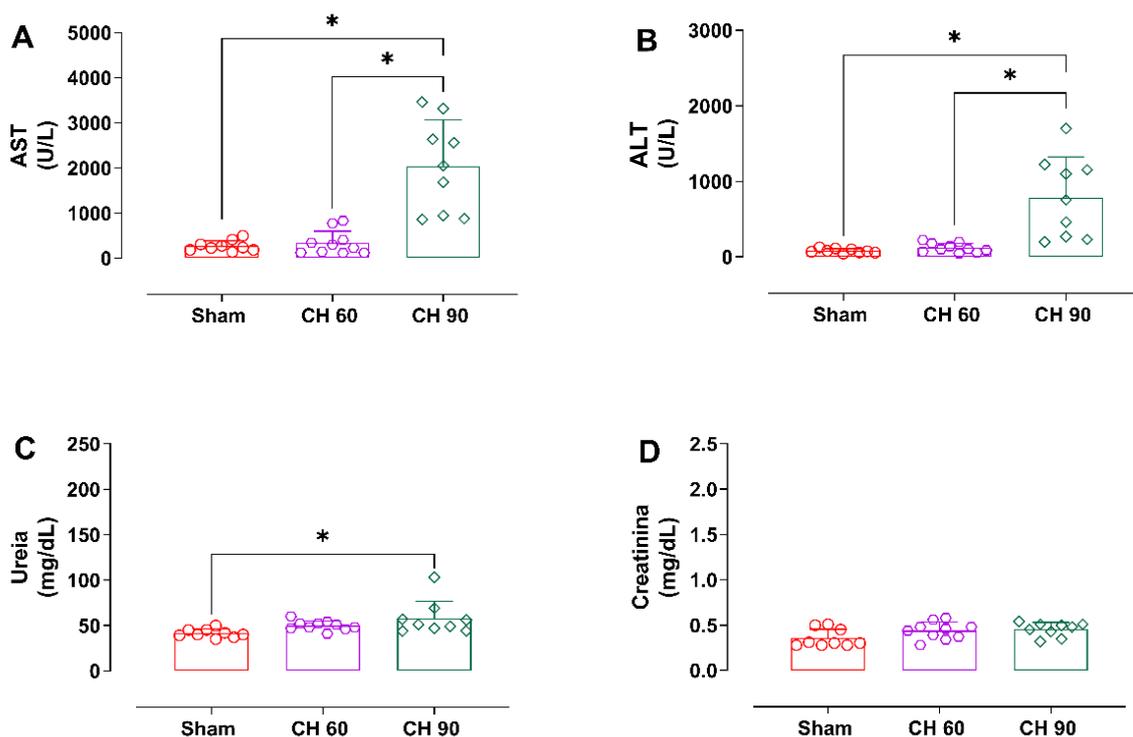
Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism® 9.0 (Califórnia, EUA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ESTABELECIMENTO DA DURAÇÃO DO CHOQUE

Os animais CH 90 apresentaram aumentos significativos nos níveis plasmáticos de AST e ALT em comparação com os ratos do grupo controle (Figura 7A e B). Os níveis de ureia (Figura 7C) estavam ligeiramente elevados no grupo CH 90, mas não houve alteração na creatinina (Figura 7D). Entretanto, não foram encontradas alterações destes marcadores no grupo CH 60. Não foram observadas mortes dos animais em nenhum dos dois protocolos utilizados.

Figura 7 – Duração do choque hemorrágico é determinante para a disfunção de órgãos



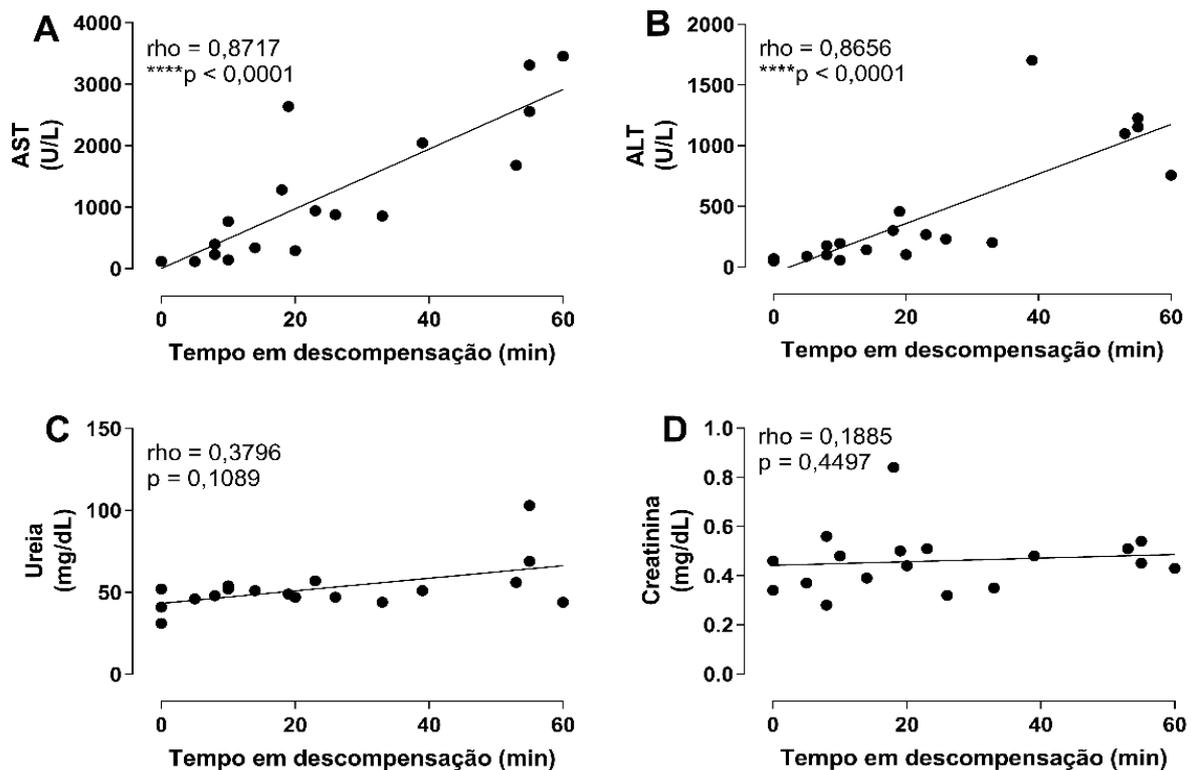
Os ratos submetidos a 60 (CH 60) ou 90 minutos (CH 90) de choque. O sangue foi coletado 24 horas após a reperfusão. Animais falso-operados foram utilizados como controle. A: aspartato aminotransferase (AST); B: alanina aminotransferase (ALT); C: ureia; D: creatinina. Cada símbolo representa um animal. As barras verticais representam a média e as barras de erro representam o DP (n = 9 - 10). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey (\*p < 0,05 vs. sham).

Fonte: elaborado pelo autor

## 6.2 RELAÇÃO DO DANO HEPÁTICO/DISFUNÇÃO RENAL E TEMPO DE DESCOMPENSAÇÃO

O tempo médio da fase de descompensação, ou seja, o tempo médio do momento em que os animais perderam a capacidade de manter a pressão em 40 mmHg e o fim do choque foi de  $9,3 \pm 6,7$  e  $40,3 \pm 15,8$  minutos para os grupos CH 60 e CH 90, respectivamente. Foi encontrada uma correlação positiva significativa ( $p \leq 0,001$ ) entre e os níveis de AST (Figura 8A) e ALT (Figura 8B) e o tempo em que os animais permaneceram na fase de descompensação. Por outro lado, os marcadores de disfunção renal não apresentaram correlação significativa com o tempo na fase de descompensação (Figuras 8C e D).

Figura 8 – A duração da fase de descompensação está diretamente relacionada ao dano hepático, mas não à disfunção renal



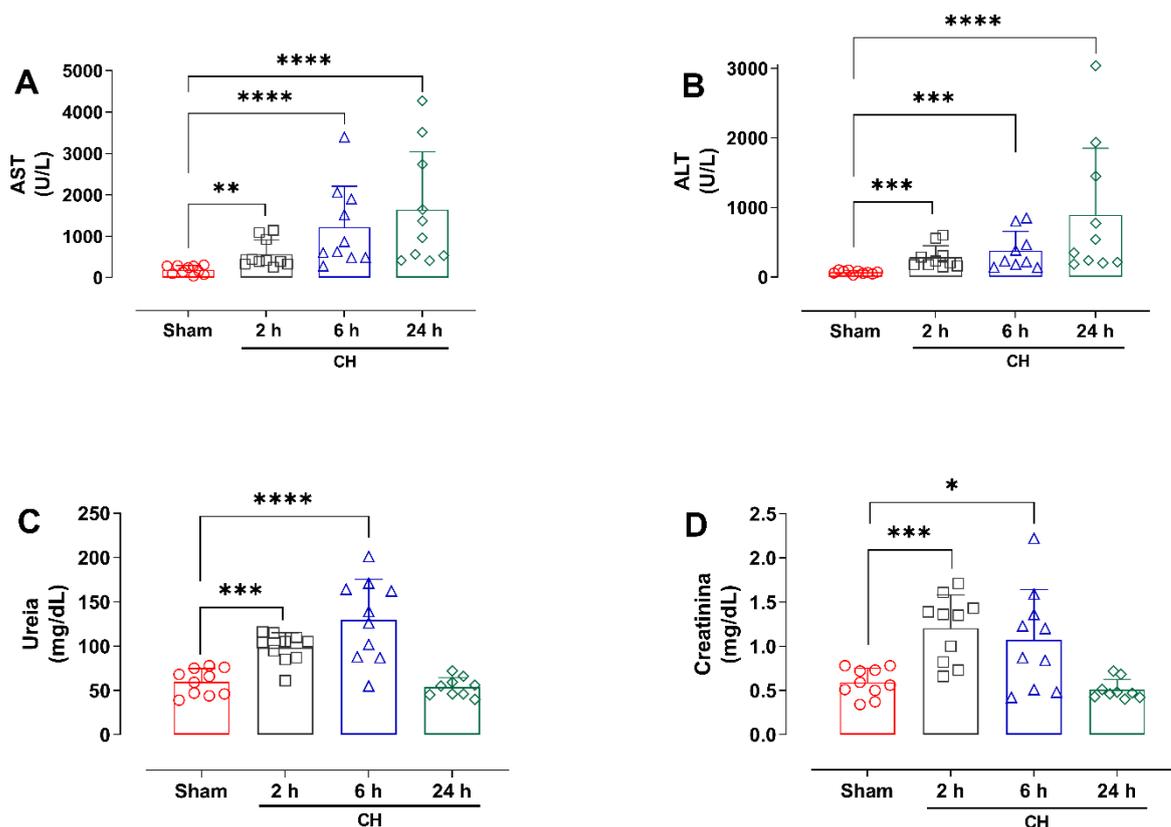
Os ratos foram submetidos ao protocolo de choque hipovolêmico e o sangue foi coletado 24 horas após a reperusão. Os valores de A: aspartato aminotransferase (AST); B: alanina aminotransferase (ALT); C: ureia e D: creatinina foram dispostos no eixo Y, e a duração (minutos) da fase de descompensação no eixo X. Cada símbolo representa um animal. O teste de correlação de Pearson foi aplicado. Os valores exatos de rho e p estão indicados nas figuras.

Fonte: elaborado pelo autor

### 6.3 AVALIAÇÃO TEMPORAL DO DANO HEPÁTICO E DISFUNÇÃO RENAL INDUZIDOS POR CHOQUE HEMORRÁGICO

Os marcadores de dano hepático AST (Figura 9A) e ALT (Figura 9B) aumentaram 2 horas após o choque e continuaram a aumentar progressivamente por pelo menos 24 horas. Por outro lado, os níveis de ureia (Figura 9C) e creatinina (Figura 9D) elevaram-se expressivamente 2 e 6 horas após o insulto, e a análise estatística mostrou que, neste contexto, os valores de ureia e creatinina 24 horas após o choque são semelhantes aos dos animais de controle.

Figura 9 – Evolução temporal dos marcadores de lesão hepática e disfunção renal após o choque hemorrágico



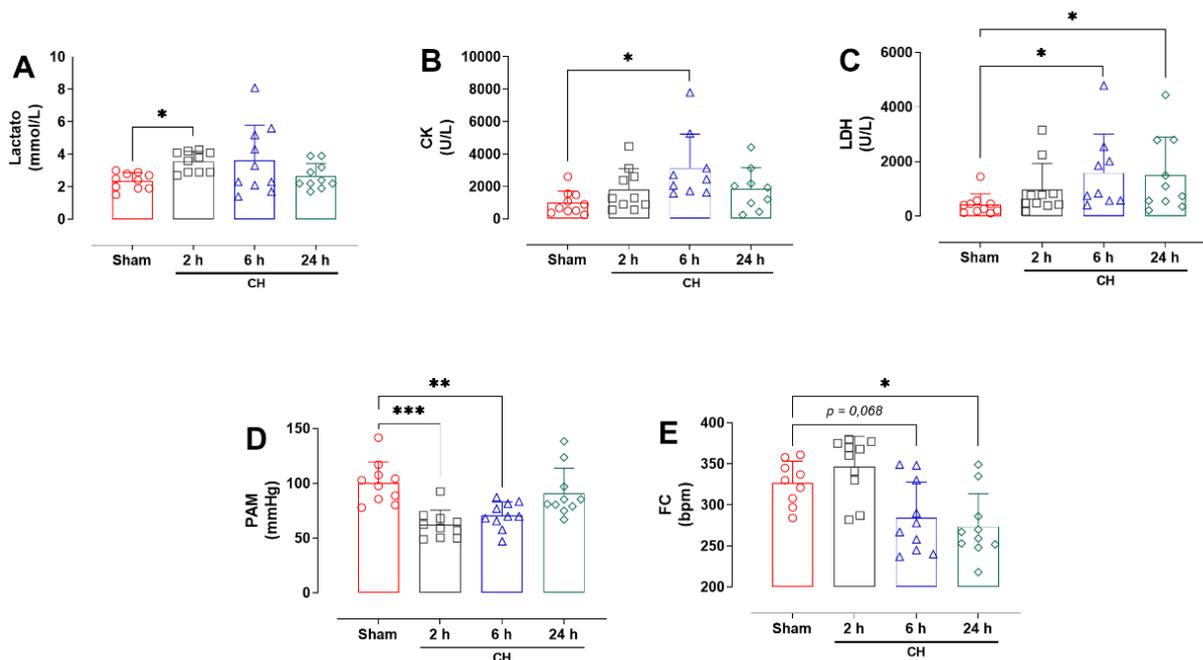
O sangue foi coletado 2 (□), 6 (△) ou 24 horas (◇) após o protocolo de CH. Animais falso-operados foram utilizados como controle (○). Foram avaliadas a função renal (A: ureia; B: creatinina) e a lesão hepática (C: aspartato aminotransferase (AST); D: alanina aminotransferase (ALT)). Cada ponto representa um animal. Os dados são apresentados como média ± DP. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001 (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

Fonte: elaborado pelo autor

## 6.4 AVALIAÇÃO TEMPORAL DE MARCADORES GERAIS DE DISFUNÇÃO ORGÂNICA E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

O lactato (Figura 10A), um marcador de hipóxia/hipoperfusão tecidual, apresentou aumento apenas 2 horas após a cirurgia e retornou aos valores semelhantes aos do grupo controle em momentos posteriores. Entretanto, padrões indicativos de progressão do dano também foram observados para outros marcadores de lesão orgânica geral, como CK (Figura 10B) e LDH (Figura 10C), que apresentaram aumentos em momentos tardios (6 e 24 horas), sugerindo uma disfunção orgânica múltipla progressiva, assim como observado para o fígado. Além disso, foi observado também hipotensão 2 e 6 horas após o choque (Figura 10D) e uma bradicardia tardia (Figura 10E), sugerindo possível disfunção cardiovascular associada à disfunção orgânica.

Figura 10 – Efeito do choque hemorrágico em marcadores sistêmicos e parâmetros cardiovasculares



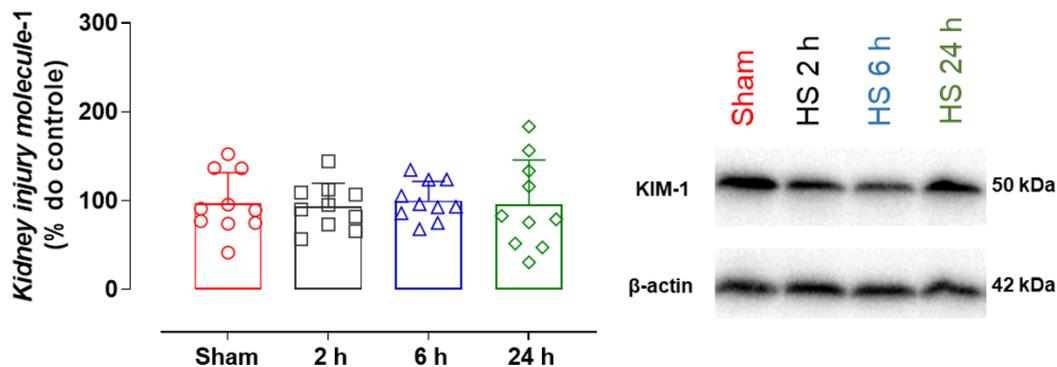
Os ratos foram canulados 2 (□), 6 (△) ou 24 horas (◇) após o protocolo de CH para determinação dos parâmetros cardiovasculares e coleta de sangue. Animais sham foram utilizados como controle (○). A: Lactato; B: Creatina Quinase; C: Lactato Desidrogenase; D: Pressão arterial média (PAM); E: Frequência cardíaca (FC). Cada ponto representa um animal. Os dados são apresentados como média ± DP. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

Fonte: elaborado pelo autor

## 6.5 AVALIAÇÃO TEMPORAL DO MARCADOR DE DANO RENAL

O marcador específico de lesão renal, KIM-1, foi quantificado no tecido renal dos animais por meio de *Western blotting* (Figura 11). Curiosamente, os níveis de KIM-1 permaneceram inalterados após o insulto, indicando que, apesar da disfunção renal transitória observada nos animais, o insulto não resultou em danos significativos às células e tecidos.

Figura 11 – Níveis de *kidney injury molecule-1* no tecido renal de animais submetidos ao choque hemorrágico



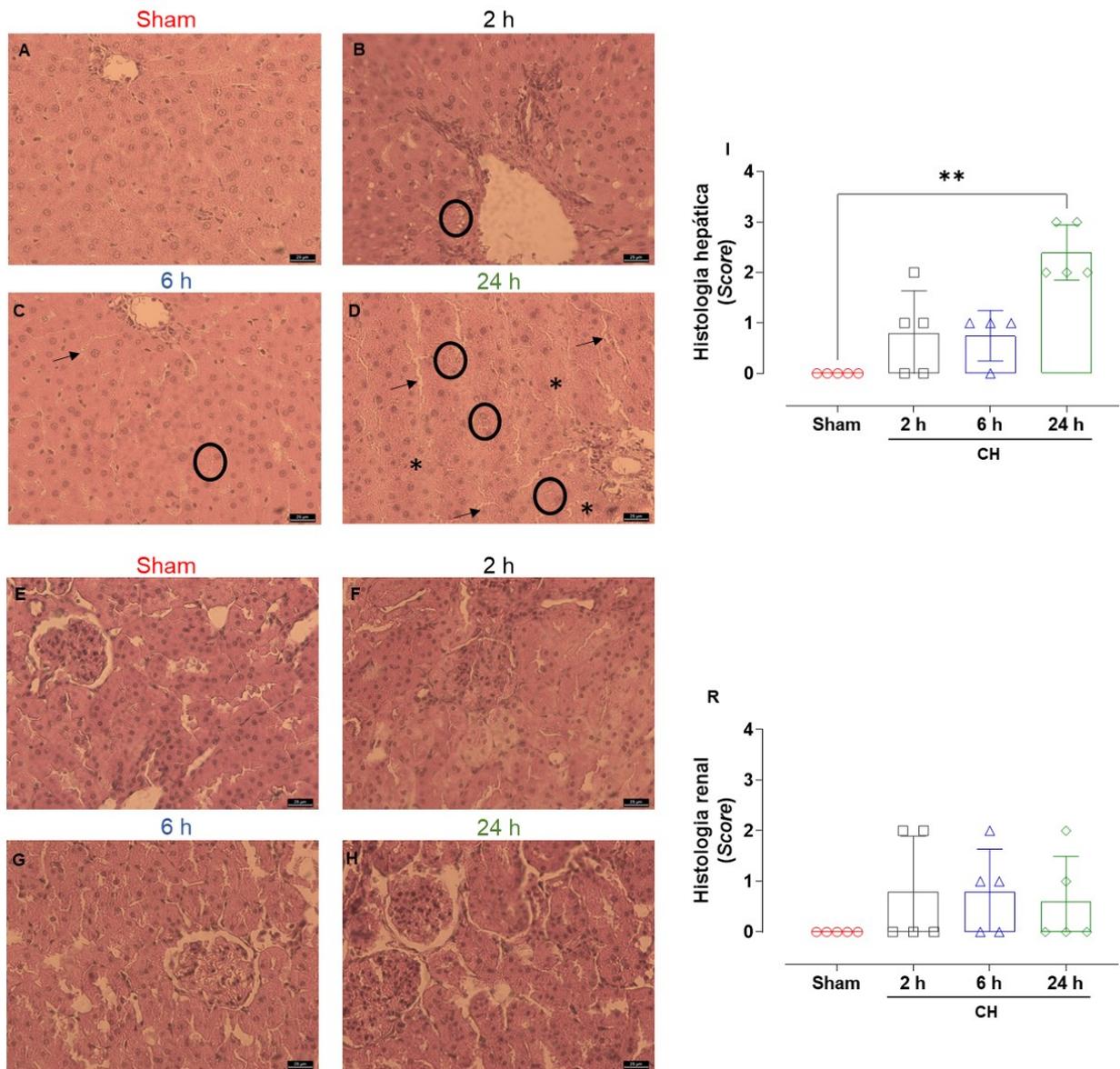
Os tecidos renais foram obtidos 2 (□), 6 (△) ou 24 horas (◇) após o CH e foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido para análise do marcador de dano renal KIM-1. Animais sham foram utilizados como controle (○). Cada ponto representa um animal. Os dados são apresentados como média ± DP.

Fonte: elaborado pelo autor

## 6.6 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS INDUZIDAS PELO CHOQUE HEMORRÁGICO

Vinte e quatro horas após o insulto, os ratos submetidos ao CH apresentaram danos hepáticos caracterizados por vacuolização (vacúolos podem ser observados dentro dos círculos), edema difuso (asterisco) e intensa dilatação sinusoide (setas), conforme mostrado na Figura 12D. No entanto, a análise do tecido renal não revelou diferenças significativas entre os grupos.

Figura 12 – Achados histológicos no rim e fígado após choque hemorrágico



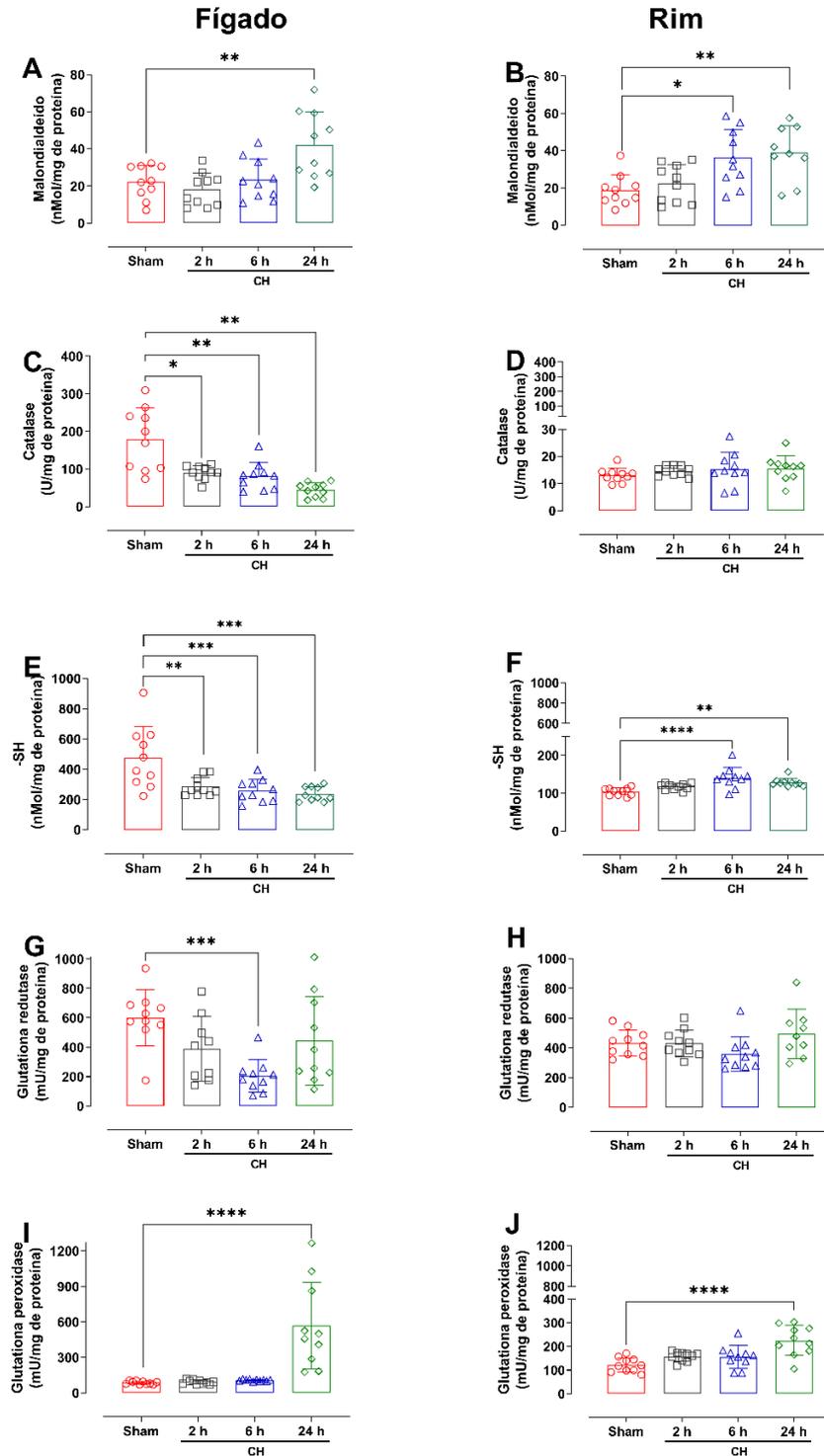
Os tecidos foram coletados 2 (□), 6 (△) ou 24 horas (◇) após o CH e corados com hematoxilina e eosina (HE). Animais sham foram utilizados como controle (○). Seções representativas do fígado e rim são mostradas com aumento de 40x (fígado: A - D; rim: E - H). Os escores de lesão são exibidos nos gráficos I e R e foram obtidos conforme detalhado na seção de Métodos. Os dados são expressos como média ± DP, e os grupos foram comparados usando o teste de Kruskal-Wallis.

Fonte: elaborado pelo autor

## 6.7 AVALIAÇÃO TEMPORAL DE MARCADORES ESTRESSE OXIDATIVO TISSULAR APÓS O CHOQUE HEMORRÁGICO

Os níveis de malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica, estavam elevados nos tecidos hepático (Figura 13A) e renal (Figura 13B). A análise da catalase tecidual mostrou uma redução nos níveis dessa enzima no fígado (Figura 13C), enquanto no rim (Figura 13D), os níveis dessa enzima de defesa contra estresse oxidativo não sofreram alterações ao longo do tempo. Os níveis de sulfidrila livre no fígado (Figura 13E) também foi reduzido, enquanto houve um aumento no tecido renal em comparação com o grupo controle (Figura 13F), sugerindo um estado de oxidação elevado no fígado. Os níveis de GR apresentaram redução no tecido hepático 6 horas após o choque (Figura 13G), porém permaneceram inalterados no tecido renal (Figura 13H). Já os níveis da GPx estavam elevados 24 horas após o choque tanto no fígado, quanto no rim (Figura 13I e J).

Figura 13 – Evolução dos marcadores de estresse oxidativo nos tecidos renais e hepáticos após o choque hemorrágico



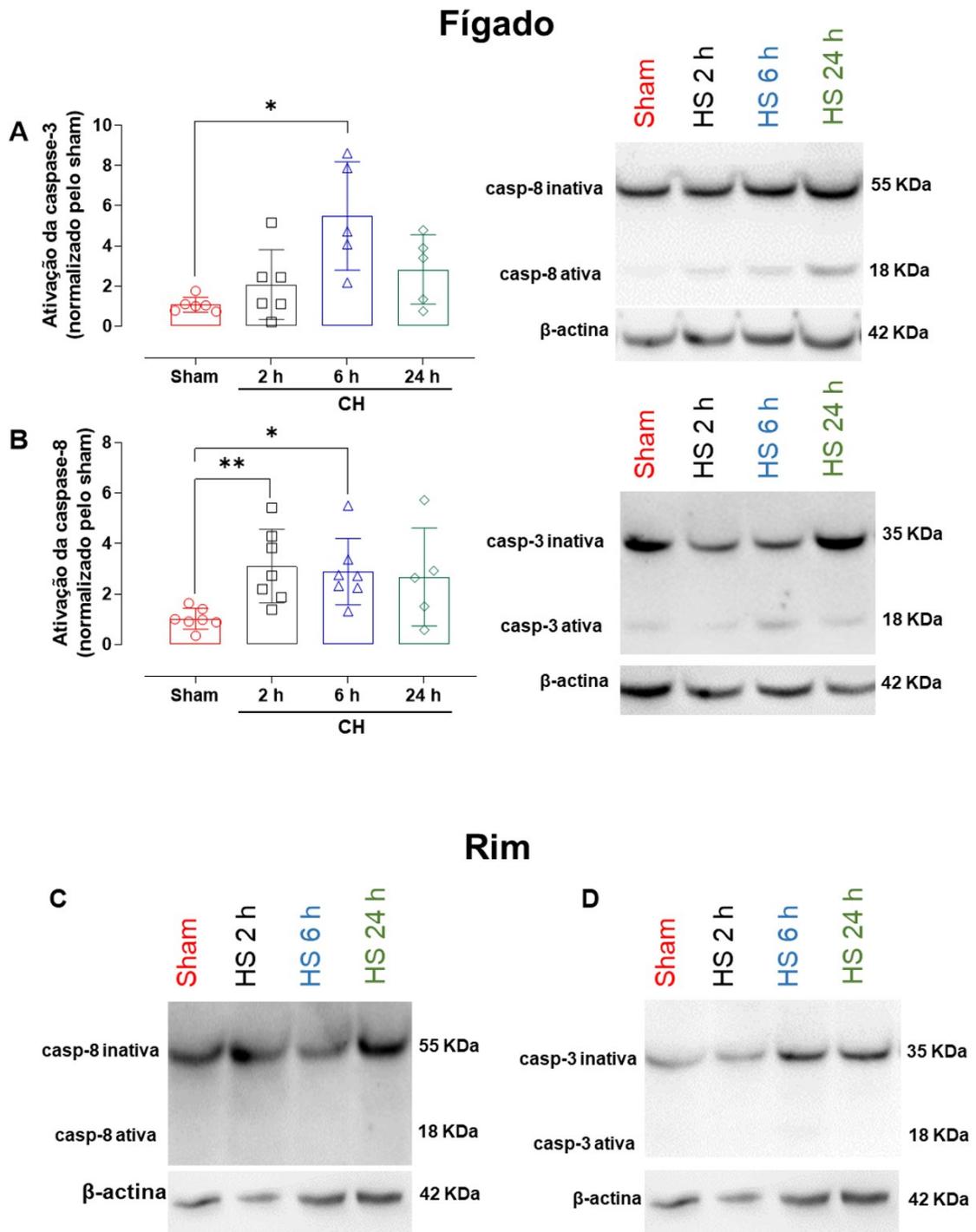
Os tecidos foram obtidos 2 (□), 6 (△) ou 24 horas (◇) após o CH e foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido para análise dos marcadores de estresse oxidativo. Animais sham foram utilizados como controle (○). Os níveis de malondialdeído (A e B), catalase (C e D), grupos sulfidríla livres (R-SH; E e F), glutaciona redutase (G e H) e glutaciona peroxidase (I e J) no fígado e nos rins (respectivamente) são mostrados. Cada ponto representa um animal. Os dados são apresentados como média ± DP. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001 (ANOVA unidirecional seguida do teste post hoc de Tukey).

Fonte: elaborado pelo autor

## 6.8 O CHOQUE HEMORRÁGICO ATIVA MORTE CELULAR NO FÍGADO, MAS NÃO NO RIM

A ativação da caspase-8 hepática aumentou significativamente 2 e 6 horas após o CH, conforme observado pelas bandas correspondentes à forma clivada da caspase-8 (18 kDa, Painel 14A), localizadas abaixo das bandas da caspase-8 não-clivada (55 kDa). A ativação da caspase-3 (bandas de ~18 kDa; Painel 14B) também aumentou no tecido hepático 6 horas após o insulto. No entanto, a análise do tecido renal apresentou padrões completamente diferentes, sem bandas detectáveis correspondentes aos pesos moleculares dos fragmentos ativos tanto da caspase-8 (14C) quanto da caspase-3 (14D), portanto, não foi possível mensurar ativação dessas proteínas pró-apoptóticas no tecido renal.

Figura 14 – Ativação de marcadores de morte celular nos tecidos renais e hepáticos após choque hemorrágico



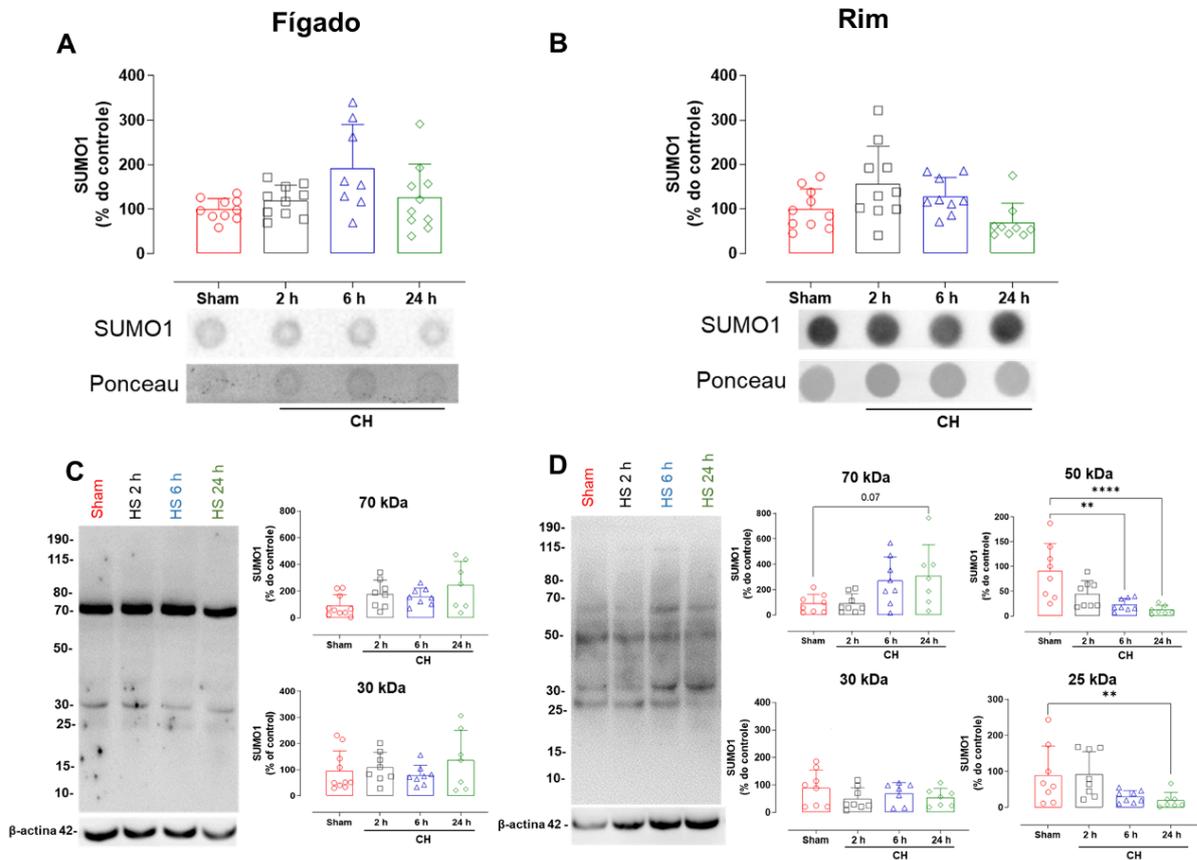
Os tecidos foram obtidos 2 (□), 6 (△) ou 24 horas (◇) após o CH, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e processados para *Western blotting*, conforme descrito nos Métodos. Animais sham foram usados como controle (○). A ativação das caspases hepáticas 8 (Painel A) e 3 (Painel B) foi quantificada como a razão entre as formas inativas e ativas, normalizada pelo grupo controle. Não foi possível determinar a ativação das caspases renais 8 (C) e 3 (D), pois não foram detectadas bandas das proteínas apoptóticas ativas. Os dados são representados como média ± DP. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

Fonte: elaborado pelo autor

## 6.9 PERFIL DE SUMO1-ILAÇÃO NOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL APÓS O CHOQUE HEMORRÁGICO

A análise por *dot blotting* indicou que os níveis totais de SUMO1 não apresentaram alterações no fígado ou rim após o CH (Figura 15A e B, respectivamente). Além disso, nenhuma diferença significativa foi observada após eletroforese das amostras hepáticas (Figura 15C; 70 e 30 kDa). Entretanto, uma diminuição substancial na intensidade da banda em 50 kDa, indicativa de desSUMO1-ilação, foi observada 24 horas após o choque no tecido renal, com uma redução de 7 vezes (Figura 15D). Uma diminuição semelhante na intensidade da banda em 25 kDa (4 vezes) foi observada também 24 horas após o insulto. Houve um aumento de aproximadamente 3,4 vezes ( $p = 0,07$ ) na intensidade da banda em 70 kDa, sugerindo SUMO1ilação de proteínas nesse peso molecular.

Figura 15 – Níveis totais e conjugados de SUMO1 no fígado e nos rins após o choque hemorrágico



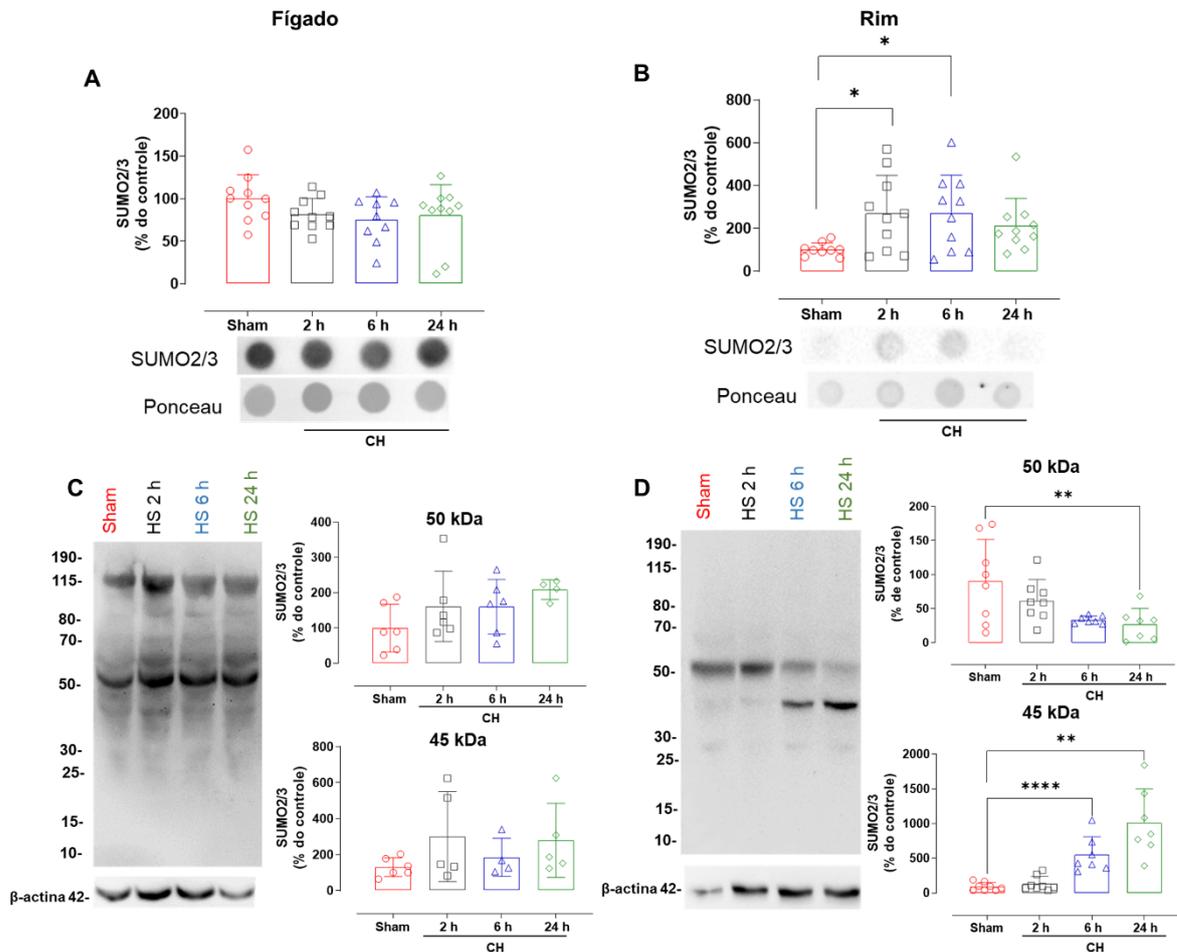
Os tecidos foram obtidos 2 (□), 6 (△) ou 24 horas (◇) após o CH, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e processados para *dot* e *Western blotting*, conforme descrito nos Métodos. Animais sham foram utilizados como controle (○). Níveis totais de SUMO1 no fígado (Painel A) e nos rins (Painel B) avaliados por *dot blotting*; Conjugação de SUMO1 após eletroforese no fígado (Painel C) e no rim (Painel D). Imagens representativas são mostradas. Cada ponto representa um animal. Os dados são representados como média ± DP. Teste de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor

## 6.10 PERFIL DE SUMO2/3-ILAÇÃO NOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL APÓS O CHOQUE HEMORRÁGICO

No fígado, nenhuma diferença foi observada através do *dot* (Figura 16A) ou *Western blotting* (Figura 16C) para SUMO2/3. No entanto, nos rins, os níveis totais de SUMO2/3 aumentaram significativamente 2 e 6 horas após o insulto (Figura 16B). A intensidade das bandas em 50 kDa diminuiu aproximadamente 3,4 vezes ao longo do tempo (Figura 16D). Contudo, a mudança mais expressiva foi observada em 45 kDa, onde houve um aumento de 11 vezes na SUMOilação de proteínas de SUMO2/3 24 horas após o CH.

Figura 16 – Níveis totais e conjugados de SUMO2/3 no fígado e nos rins após o choque hemorrágico



Os tecidos foram obtidos 2 (□), 6 (△) ou 24 horas (◇) após o CH, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e processados para *dot* e *Western blotting*, conforme descrito nos Métodos. Animais sham foram utilizados como controle (○). Níveis globais de SUMO2/3 no fígado (Painel A) e nos rins (Painel B) avaliados por *dot blotting*; Conjugação de SUMO2/3 após eletroforese no fígado (Painel C) e no rim (Painel D). Imagens representativas são mostradas. Cada ponto representa um animal. Os dados são representados como média ± DP. Teste de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

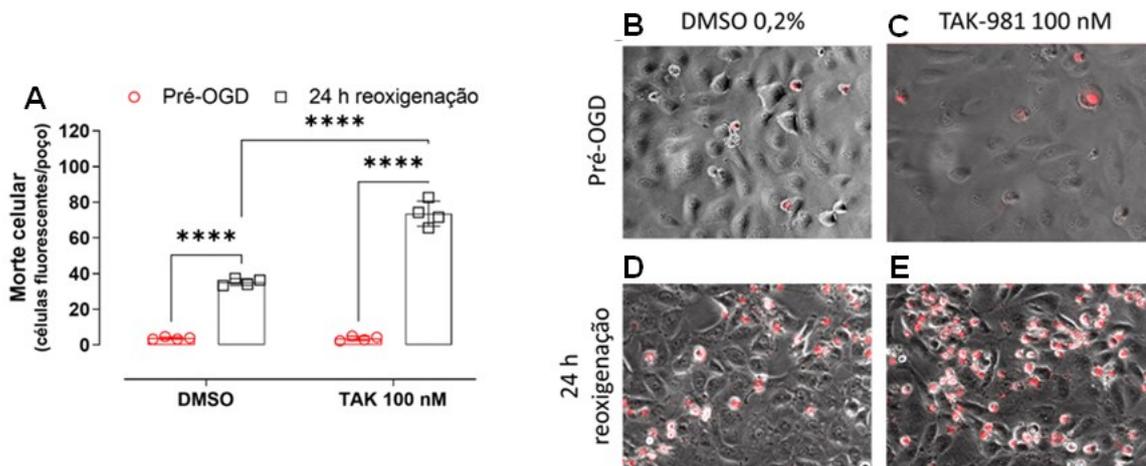
Fonte: elaborado pelo autor

## 6.11 INIBIDOR DA SUMOILAÇÃO PIORA O DANO INDUZIDO POR PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE EM CÉLULAS RENAIIS HUMANAS (HK-2)

Para avaliar se a SUMOilação desempenha um papel na resposta ao insulto por hipóxia-reoxigenação em células renais, células HK-2 foram tratadas com TAK-981 (100 nM) e submetidas a 9 horas de hipóxia, seguido de 24 horas de reoxigenação. A duração da hipóxia foi determinada a partir de experimentos preliminares demonstrados no Apêndice B. A morte celular de células tratadas com o veículo aumentou substancialmente após o OGD, conforme indicado pelo aumento de

células positivas para IP (antes:  $3,8 \pm 0,6$ , Figura 17B; depois:  $35,2 \pm 1,9$ ; Figura 17D). O inibidor de SUMOilação não teve efeito na viabilidade celular antes do insulto (Figura 17C,  $3,6 \pm 1,2$ ), mas dobrou o número de células positivas para IP após o OGD (Figura 17E,  $73,6 \pm 7,0$ ,  $p < 0,0001$ ). Por fim, o TAK-981 não teve efeito na viabilidade de células controle (não submetidas ao OGD, Apêndice C).

Figura 17 – Efeito do TAK-981 na viabilidade celular após privação de oxigênio e glicose seguida de reoxigenação



As células foram cultivadas em placas de 6 poços e submetidas a um período de 9 horas de privação de oxigênio e glicose (OGD). Células não submetidas à hipóxia ou privação de glicose foram utilizadas como controles. O período de reoxigenação foi de 24 horas. Para a análise de PI (A), as células foram incubadas com 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de iodeto de propídeo (IP) por 15 minutos, e as imagens foram obtidas imediatamente antes do protocolo de OGD (barras vermelhas) e após 24 horas de reoxigenação (barras pretas). As imagens B e C representam as células tratadas com DMSO e TAK-981 antes do OGD, enquanto as figuras D e E representam estas mesmas células após 24 horas de reoxigenação, respectivamente. Cada ponto representa o valor médio obtido a partir de 3 campos de cada poço. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

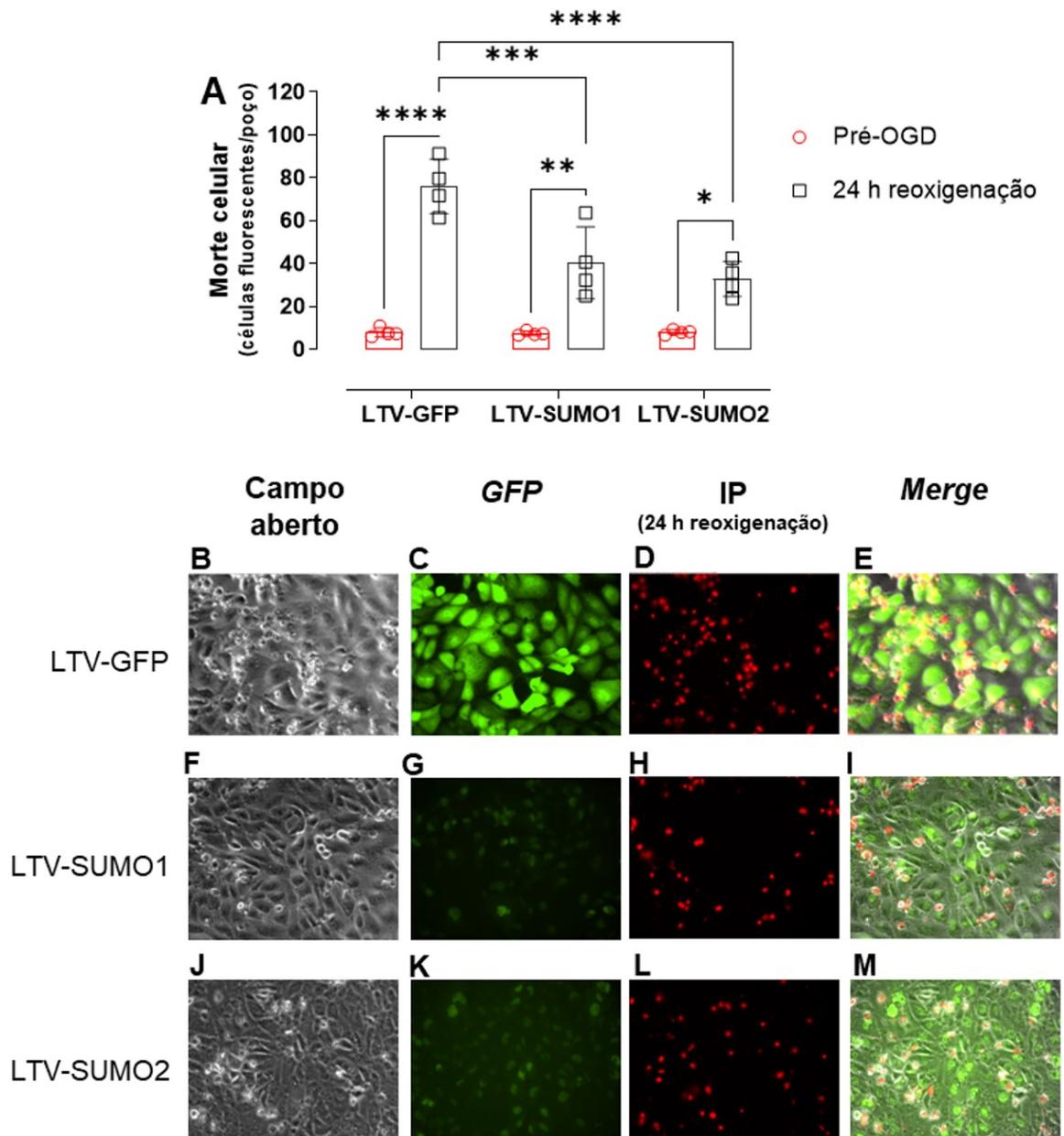
Fonte: elaborado pelo autor

## 6.12 SUPEREXPRESSÃO DE SUMO1 OU SUMO2 PROTEGE CONTRA MORTE CELULAR INDUZIDA PELA PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE

As células mutadas com vetor de lentivírus que promove a expressão de GFP (LTV-GFP, Figura 18C) foram submetidas a 9 horas de OGD seguidas por 24 horas de reoxigenação, o que resultou em aumento de células positivas para IP (Figura 18D). A superexpressão de SUMO1 (LTV-SUMO1, Figura 18G) ou SUMO2 (LTV-SUMO2, Figura 18K) pareceu conferir maior resistência ao dano de hipóxia-reoxigenação, conforme indicado pelo número menor células positivas para IP após o

protocolo de OGD em comparação com as células de controle (Figuras 18A, H e L). Células controle foram submetidas a etapas de lavagem, porém sem hipóxia ou privação de glicose, não apresentaram alterações (Apêndice D).

Figura 18 – Efeito da expressão aumentada de proteínas SUMO na viabilidade celular após privação de oxigênio e glicose seguida de reoxigenação



Partículas de lentivírus foram utilizadas para criar células HK-2 mutadas que superexpressam SUMO1 (LTV-SUMO1), SUMO2 (LTV-SUMO2) ou apenas GFP (LTV-GFP). LTV-GFP foram utilizadas como controle. As células foram incubadas com 6 µg/mL de IP por 15 minutos e as imagens foram obtidas imediatamente antes do protocolo de OGD (barras vermelhas) e após 24 horas de reoxigenação (barras

pretas). A: Quantificação de células positivas para IP; Coluna de campo aberto: Imagens em campo claro após 24 horas de reoxigenação; GFP: Imagens de fluorescência verde após 24 horas de reoxigenação; PI: Imagens de fluorescência vermelha após 24 horas de reoxigenação; Merge: Imagens mescladas de Campo aberto, GFP e PI. Cada ponto representa a média de 3 campos de cada poço. Os dados são representados como média  $\pm$  DP. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor

## 7 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a tolerância renal à lesão por isquemia-reperfusão induzida pelo CH acontece ao mesmo tempo que existem alterações significativas na SUMOilação de proteínas renais. Por outro lado, o tecido hepático, que sofreu intenso dano associado ao CH, não apresentou nenhuma alteração significativa na SUMOilação. Estas descobertas *in vivo* são corroboradas pelo aumento da morte de células renais tratadas com um inibidor de SUMOilação após o dano por OGD-reoxigenação, enquanto a superexpressão de proteínas SUMO1 ou SUMO2 teve efeito citoprotetor.

Inicialmente, o objetivo deste estudo foi estabelecer e validar um modelo animal de disfunção múltipla de órgãos induzida CH controlado por valor de pressão fixa. Buscou-se padronizar um modelo experimental que permitisse avaliações tardias (>12 horas) da disfunção orgânica. Ademais, buscou-se investigar os mecanismos da resiliência renal observada nos animais submetidos ao CH, uma vez que os animais não apresentaram dano renal, porém tiveram dano em outros sistemas. Apesar de modelos animais de CH serem utilizados há décadas, há uma infinidade de protocolos disponíveis na literatura, o que representa um desafio para reprodutibilidade do modelo (FÜLÖP et al., 2013). Em roedores, existem três tipos principais de protocolos de CH: hemorragia não controlada, hemorragia de volume fixo e hemorragia de pressão fixa (TREMOLÉDA et al., 2017). Como o principal interesse deste estudo era o modelo de hemorragia controlada por pressão, foi realizado um levantamento de estudos que utilizaram esse método (Quadro 4). Dentre as variáveis observadas, os valores-alvo de PAM apresentam uma certa constância através dos estudos, estando entre 30 e 40 mmHg. Desta forma, decidiu-se estabelecer um valor de PAM fixa de 40 mmHg como ponto de partida para a padronização do protocolo de CH.

No entanto, mesmo dentro destes estudos levantados, há diferenças substanciais nas variáveis experimentais como o tipo de fluido de reposição utilizado e a duração do choque. Portanto, realizou-se um estudo comparativo inicial no qual os animais eram submetidos a protocolos de CH com durações diferentes. Ademais, uma vez que o objetivo era fazer uma análise em um modelo não-agudo, as coletas aconteceram 24 horas após a ressuscitação. Inicialmente foram utilizados AST, ALT, ureia e creatinina como marcadores da função orgânica, uma vez que a maioria dos sistemas de estadiamento de dano orgânico utiliza marcadores como estes na clínica

e são alternativas práticas e baratas para avaliação da função orgânica (MIZOCK, 2009).

Curiosamente, apesar de toda a manipulação cirúrgica e do tempo em choque, animais submetidos a um protocolo de 60 minutos não apresentaram nenhuma elevação dos marcadores plasmáticos citados, sugerindo que este protocolo não era capaz de causar falência de órgãos. Já os animais submetidos a 90 minutos de choque apresentaram elevação intensa de AST e ALT e uma discreta elevação de ureia. As análises de correlação mostraram que no que diz respeito à lesão hepática, o tempo em que os animais ficaram em fase de descompensação é determinante para o dano no fígado. De fato, o trato gastrointestinal é particularmente sensível a danos causados por trauma e isquemia (WRBA et al., 2017). Danos à barreira intestinal induzidos por isquemia podem levar à translocação bacteriana e liberação de endotoxinas do lúmen intestinal para o fígado através do sistema porta hepático. Isso pode desencadear a produção e liberação de vários mediadores locais pró-inflamatórios, que podem causar uma diminuição significativa na microcirculação hepática e na função dos hepatócitos (DEITCH et al., 1990; KOO; LIANG, 1977; SWANK; DEITCH, 1996).

Já em relação aos marcadores de função renal, o aumento dos níveis de ureia induzido pelo CH em 24 horas foi bem menos expressivo que o aumento dos marcadores de dano hepático. Já os níveis de creatinina, usada como principal marcador para avaliação de função renal na clínica (HUTCHINGS et al., 2017), não apresentaram alterações. Além disso, não se observou uma relação direta entre tempo em fase de descompensação e elevação dos níveis plasmáticos dos marcadores renais. Observar elevação de marcadores de função renal em modelos experimentais em roedores pode ser um desafio. Estudos da década de 70 já defendiam que a lesão nas células renais induzida por CH parece ser subletal, com a composição da urina dos animais retornando ao normal após 48 horas de isquemia (KREISBERG et al., 1976). Portanto, levantou-se a possibilidade que a avaliação feita 24 horas após a reperusão dos animais trazia como resultado parâmetros renais já recuperados e, ao fazer essa avaliação tardia, estaria passando da janela de dano renal induzido pelo CH nos animais.

Portanto, para determinar se o modelo não era capaz de causar uma disfunção renal ou se a disfunção não era descoberta por consequência do horário da análise escolhido, foi realizada uma curva temporal para os marcadores anteriormente

citados. Interessantemente, a elevação dos marcadores de disfunção renal foi identificada em tempos mais iniciais. Da mesma forma, marcadores de dano hepático também já se encontravam mais elevados em tempos iniciais. Entretanto, uma diferença importante na progressão desses marcadores foi observada, sendo que o dano hepático evoluiu progressivamente à medida de que função renal apresentava tendência para retornar à normalidade em 24 horas. Estes achados sugerem que o sistema renal apresentou uma resistência ao dano ou um mecanismo de reparo eficiente, que reestabeleceu a função deste órgão com o passar do tempo.

A partir de então tornou-se necessário averiguar se a evolução negativa era uma exclusividade do fígado (falência de um único órgão) ou se outros sistemas também apresentavam deterioração progressiva (falência de múltiplos órgãos). Marcadores gerais LDH e CK, que predizem desfechos negativos para falência de múltiplos órgãos (VARGHESE, 2005; VESELL; FELDMAN; FRANK, 1959), apresentaram elevação progressiva, assim como AST e ALT. Além disso, os animais apresentaram queda tardia de valores de PAM e FC basais. Estes resultados sugerem que o modelo de CH estava, de fato, induzindo uma falência orgânica em diferentes sistemas, incluindo dano cardiovascular, e que essas alterações duravam por, pelo menos, 24 horas. Alterações cardiovasculares prolongadas podem estar presentes em pacientes politraumatizados que desenvolvem tanto disfunção de um único quanto múltiplos órgãos, sendo a prevalência de disfunção cardiovascular maior em pacientes com falência múltipla (DURHAM et al., 2003). Estes achados evidenciaram ainda mais a controvérsia em relação à resiliência renal em comparação com o desenvolvimento do dano em outros sistemas.

É importante ressaltar, no entanto, que ureia e creatinina são marcadores de função (LOPEZ-GIACOMAN, 2015) e não de dano, como é o caso de AST e ALT (MCGILL, 2016). Portanto, nesta etapa do estudo era possível apenas concluir que a função renal melhorava com o passar do tempo, porém estes achados não poderiam ser extrapolados para uma avaliação de dano tecidual. Sabe-se que o rim é um órgão que é submetido a uma gama variada de estímulos, mesmo em estados fisiológicos. Isto faz com que o rim seja um órgão com uma reserva funcional excepcional (SHARMA; MUCINO; RONCO, 2014). Inclusive, é possível viver normalmente mesmo após a perda de um dos rins, uma vez que o rim remanescente consegue suprir as necessidades do organismo até mesmo em circunstâncias que possam requerer maior esforço do organismo, como a gravidez (VAN BUREN et al., 2023). Desta forma,

procurou-se investigar o dano renal a partir da quantificação de KIM-1, que tem sua expressão aumentada em células do túbulo proximal em resposta a danos celulares. Esta molécula serve como um biomarcador específico e sensível para lesão renal (BONVENTRE, 2008). Uma vez que não foi observado aumento nos níveis de KIM-1 no tecido renal, sugere-se que, embora os animais tenham apresentado disfunção renal transitória, o insulto induzido por este protocolo de CH não foi suficiente para causar danos ao tecido renal.

Os dados histológicos corroboraram os achados relacionados aos níveis de KIM-1, pois não foram observados danos significativos no tecido renal. Sabe-se que o processo de isquemia-reperfusão pode causar danos às células renais, sendo as células do túbulo contorcido proximal especialmente sensíveis a este tipo de insulto (BONVENTRE; YANG, 2011). Os achados histológicos mais comumente observados em diferentes modelos que induzem dano renal são a perda da borda em escova dos túbulos proximais, vacuolização e edema, que são na maioria das vezes reversíveis (TIRAPELLI et al., 2009). Se a agressão tecidual não for cessada, o dano evolui para morte celular por diferentes mecanismos como apoptose, necrose e ferroptose (BONVENTRE; YANG, 2011; PRIANTE et al., 2019). Portanto, apesar de algumas biópsias renais terem apresentado achados histológicos compatíveis com o dano nos animais submetidos ao CH, é plausível supor que estes danos esporádicos e não significativos iriam progredir para a cura. Por outro lado, a avaliação histológica hepática demonstrou um dano progressivo, assim como a dosagem de AST e a ALT. Os danos tissulares são provenientes principalmente das mudanças causadas pela diminuição do aporte de oxigênio, alterações no metabolismo energético e diminuição do pH causados pela isquemia. Por outro lado, a reperfusão repentina promove o reestabelecimento do pH, que aumenta mais ainda o dano por um processo conhecido como “paradoxo do pH” (TEOH; FARRELL, 2003). Além disso, o aumento do aporte de oxigênio também piora os danos tissulares através do aumento da produção de ERO (GRANGER; KVIETYS, 2015).

Portanto, sendo o estresse oxidativo um importante mecanismo causador de inflamação e dos danos teciduais, foram avaliados os perfis oxidativos hepático e renal. Os níveis de MDA renais e hepáticos estavam elevados, sugerindo que estava havendo lipoperoxidação nestes tecidos. A lipoperoxidação é um processo no qual radicais livres atacam lipídios que contêm insaturações entre carbonos (C=C) em suas estruturas (YIN; XU; PORTER, 2011). Componentes de membranas celulares como

glicolípídios, fosfolípídios e colesterol são também alvos de modificações potencialmente letais por peroxidação (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). Ou seja, os resultados mostraram que o modelo de CH foi capaz de induzir danos aos componentes das membranas tanto das células hepáticas quanto das renais.

Para se proteger de agentes oxidantes, como os que causam a peroxidação lipídica, o organismo utiliza mecanismos de defesa antioxidantes. Estes mecanismos geralmente atuam como sequestradores/neutralizantes das espécies reativas a fim de proteger os tecidos da inflamação causada por elas. Uma redução na capacidade antioxidante favorece o aumento de espécies pró-oxidantes. A análise dos mecanismos de proteção antioxidantes hepáticos mostrou que existe uma redução considerável das atividades de enzimas como a catalase e a GR após o CH. A catalase é uma enzima que previne o dano oxidativo por degradar peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (DEISSEROTH; DOUNCE, 1970), e é conhecida por ser expressa em grandes concentrações nos hepatócitos (APTE; KRISHNAMURTHY, 2011; DE DUVE; BAUDHUIN, 1966). Já a GR faz parte do sistema glutationa, que é considerado o principal sistema redox do organismo e é responsável pela manutenção do ambiente celular reduzido, ou seja, favorecendo a manutenção das sulfidrilas não oxidadas (R-SH), que participam de vários mecanismos antioxidantes (COUTO; WOOD; BARBER, 2016; RATURI; MUTUS, 2007; ULRICH; JAKOB, 2019).

A redução das atividades destas enzimas no tecido hepático teve como consequência a redução nos níveis de sulfidrilas livres neste tecido. Portanto, apesar do fígado ser o principal órgão responsável pela proteção antioxidante, curiosamente este tecido apresentou altos níveis de estresse oxidativo. Por outro lado, a análise das enzimas antioxidantes renais mostrou que o CH não foi capaz de causar redução na atividade de nenhuma das enzimas avaliadas. Ademais, os níveis de sulfidrilas livres no tecido renal não estavam reduzidos. Na verdade, notou-se um aumento nos níveis de sulfidrilas reduzidas no tecido renal. Estes achados sugerem que o tecido renal aumentou sua capacidade antioxidante, uma vez que a dinâmica de tióis livres/oxidados é extremamente relevante para a proteção antioxidante, já que um número maior de sulfidrilas reduzidas significa uma capacidade maior de combate às espécies oxidantes (ULRICH; JAKOB, 2019). Ou seja, os resultados sugerem que após o CH, o rim evocou mecanismos de proteção antioxidantes que não foram observados no fígado.

Considerando que o estresse oxidativo pode desencadear a apoptose (BAYIR; KAGAN, 2008), avaliou-se a ativação de vias pró-apoptóticas nos dois tecidos. No processo de ativação da apoptose, mediadores de morte celular ativam caspases apicais, especialmente a caspase-8. A partir daí, inicia-se uma cascata efetora com outras caspases, como a caspase-3, culminando com a morte celular (SCHNEIDER; TSCHOPP, 2000). As análises mostraram que os padrões de ativação de caspase-3 e 8 diferem no rim e no fígado após o CH, assim como os outros parâmetros já apresentados. Enquanto as proteínas pró-apoptóticas caspase-3 e 8 foram ativadas no fígado, nenhuma diferença foi observada no rim. Esta diferença explica, pelo menos em parte, o mecanismo de dano observado no fígado e que não foi visto no rim. Estudos anteriores corroboram este achado, uma vez que o silenciamento dos genes das caspases-3 e 8 por RNA de interferência foi capaz de melhorar o dano hepático associado à isquemia-reperfusão (CONTRERAS et al., 2004).

Assim, o conjunto de resultados obtidos até este ponto sugere que os rins apresentam singularidades quando comparados com outros órgãos, como o fígado. É preciso levar em consideração que os níveis de isquemia tissular hepático e renal podem ser diferentes, uma vez que o organismo dos animais pode modular o aporte sanguíneo após o CH (NEUTZE; WYLER; RUDOLPH, 1968). Assim, a modulação do débito cardíaco e aporte sanguíneo poderia explicar as respostas diferentes observadas para o rim e para o fígado. Entretanto, existem aspectos *in loco* do tecido renal que também são discrepantes quando comparados a outros tecidos. Por exemplo, do ponto de vista vascular, durante o choque séptico, o leito renal apresenta uma resposta contrária em comparação com outros leitos vasculares (BERNARDELLI et al., 2016). Enquanto a maioria dos vasos apresenta vasoplegia, levando a hiper-responsividade e hipotensão, os vasos renais apresentam reatividade mantida ou aumentada (BOFFA; ARENDSHORST, 2005). Diferentes mecanismos moleculares têm sido propostos para explicar esses padrões contrastantes. Por exemplo, foi observada uma diminuição da atividade da GRK-2 no rim, enquanto o miocárdio apresenta aumento da atividade dessa enzima, levando a efeitos opostos na densidade dos receptores adrenérgicos nestes tecidos (ROSALES et al., 2021). Ainda não está claro se essas diferenças representam adaptações evolutivas voltadas para a proteção dos rins ou se elas são a causa da lesão renal aguda associada ao choque

séptico. No entanto, as evidências combinadas sugerem fortemente que o tecido renal possui características bioquímicas *in loco* que não estão presentes em outros órgãos

Portanto, os dados mostram que os rins possuem mecanismos de resistência contra a lesão induzida por isquemia. Interessantemente, diretrizes do Ministério da Saúde sobre transplante de órgãos, que determinam o tempo de isquemia máximo para cada órgão, apontam que o rim suporta um dos maiores tempos de isquemia, podendo ser transplantado até 48 horas após a coleta. Por outro lado, o fígado suporta apenas até 12 horas (BRASIL, 2022). Estas observações apontam para uma habilidade renal que parece derivar de mecanismos bioquímicos *in situ*. Portanto, surgiu a hipótese de que a SUMOilação de proteínas, uma modificação pós-traducional conhecida por suas propriedades citoprotetoras (CELEN; SAHIN, 2020; CHANG; YEH, 2020; LEE et al., 2007) poderia ser um dos mecanismos associados à resiliência renal.

A SUMOilação é conhecida por promover proteção celular no sistema nervoso central quando submetido à isquemia (BERNSTOCK et al., 2018; DATWYLER et al., 2011; SILVEIRINHA; STEPHENS; CIMAROSTI, 2013). No entanto, o papel dessa modificação pós-traducional pode variar em diferentes órgãos e cenários (OLIVEIRA et al., 2022). No que diz respeito à SUMOilação nos rins, é razoável supor que as funções de muitas proteínas renais sejam reguladas pela SUMOilação, uma vez que o rim é um órgão que está constantemente submetido a diferentes estímulos. Um estudo utilizou células imortalizadas corticais de ducto coletor para avaliar quais proteínas seriam passíveis de sofrerem SUMOilação. A análise por proteômica mostrou que um total de 741 e 971 proteínas são potenciais alvos para SUMOilação por SUMO1 e SUMO2/3, respectivamente, nessas células (WU et al., 2019). Apesar da SUMOilação representar uma modificação pós-traducional com potenciais consequências importantíssimas para a fisiopatologia renal, existem poucos estudos na literatura que tenham estudado consequências fisiológicas ou patológicas da SUMOilação no rim.

Alguns autores propuseram que a SUMOilação tem papel importante na patogênese da nefropatia diabética. Células mesangiais tratadas com altas concentrações de glicose apresentaram níveis elevados de proteínas SUMO1 e SUMO2/3 (GAO et al., 2014; HUANG et al., 2013) e células endoteliais glomerulares tratadas com TNF- $\alpha$  ou interleucina (IL)-2 apresentaram elevação de SUMO4 (CHEN et al., 2014). Os autores também argumentam com uma série de estudos que mostram

o papel da SUMOilação na regulação de fatores de transcrição relevantes para o estabelecimento de inflamação e fibrose, como o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (MABB; MIYAMOTO, 2007), o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) (IMOTO et al., 2008), e da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (GUO; SHARROCKS, 2009). Entretanto, apesar da plausibilidade mecânica e dos dados apresentados, essas conclusões ainda são incipientes e mais estudos precisam ser realizados para investigar se realmente a SUMOilação é parte importante no desenvolvimento da nefropatia diabética.

Um único estudo investigou a importância da SUMOilação no dano isquêmico renal. Usando um modelo *in vivo* de isquemia renal por oclusão da artéria renal em camundongos, os autores mostraram que a SUMO1-ilação global diminuiu no rim logo após 30 minutos de isquemia e aumentou oito horas após a reperfusão, embora os níveis tenham caído novamente 24 e 48 horas após a reperfusão. Por outro lado, os níveis de SUMO2/3, que também diminuíram logo após a isquemia, se mantiveram elevados em todos os tempos analisados após a reperfusão. Embora os autores não tenham realizado nenhuma investigação molecular adicional considerando a lesão isquêmica *per se*, eles descobriram, usando um modelo *in vitro* de lesão renal aguda induzida por cisplatina, que a inibição da SUMOilação pelo ácido gincólico piorava a viabilidade celular (GUO et al., 2015). Portanto, afirmaram que a SUMOilação, principalmente por SUMO2/3, representaria um mecanismo citoprotetor no tecido renal após a isquemia/reperfusão. Apesar dos modelos de insultos serem diferentes, os resultados aqui apresentados parecem corroborar os achados de Guo e colaboradores (2015). Foram encontradas alterações significativas no perfil de SUMOilação renal após CH, particularmente nos níveis totais e na conjugação de SUMO2/3, com alterações menores na conjugação de SUMO1. Uma vez que a hipótese do estudo era de que a SUMOilação renal aumentaria, isto se confirmou com estes resultados. Por outro lado, os resultados mostraram que não houve diminuição na SUMOilação hepática, mas sim a ausência de qualquer alteração nos níveis de SUMO neste órgão, não confirmando a hipótese inicial em relação ao fígado. Estes achados sugerem, pela primeira vez, que pode haver uma relação entre a proteção renal e a SUMOilação após o CH.

Embora até este momento não tenha sido possível estabelecer uma relação causal entre aumento da SUMOilação e a resistência renal, pode haver uma relação entre estes achados. Vale ressaltar que a SUMOilação é uma modificação pós-

traducional que depende do gasto de ATP para acontecer (FLOTTHO; MELCHIOR, 2013) e que após o CH os níveis de ATP diminuem devido ao metabolismo anaeróbio (LUNDGAARD-HANSEN, 1966). Entretanto, mesmo num ambiente com redução de ATP, o tecido renal ainda prioriza a utilização do ATP em prol do aumento da SUMOilação.

Portanto, para aprofundar a investigação, foram utilizadas células HK-2 para avaliar o potencial papel da SUMOilação na proteção renal contra o CH. As células HK-2, que são células epiteliais imortalizadas do túbulo proximal, são frequentemente utilizadas para investigar os efeitos da lesão induzida por isquemia no tecido renal (BARISIONE et al., 2021; LIU et al., 2020; SUZUKI et al., 2008). As células do túbulo proximal são particularmente susceptíveis à isquemia e requerem um suprimento contínuo de oxigênio e nutrientes para funcionar de forma ideal (BONVENTRE; YANG, 2011).

Portanto, submetemos as células HK-2 ao OGD e examinamos a viabilidade celular após o insulto. As células foram tratadas com TAK-981, um inibidor da enzima ativadora E1 (também conhecida como SAE1/SAE2), que leva ao comprometimento da SUMOilação (LANGSTON et al., 2021) e este tratamento diminuiu significativamente a viabilidade celular. Assim, nossos achados indicam que o aumento na SUMOilação de proteínas pode ser uma alteração crucial para proteger células do túbulo contorcido proximal.

O TAK-981 é também conhecido como subsumstat. Um estudo de fase 2 que investiga o potencial antineoplásico deste inibidor da SUMOilação no tratamento de cânceres hematológicos está sendo conduzido (identificador na plataforma *Clinicaltrials.gov*: NCT03648372). É interessante pontuar que a SUMOilação é uma modificação com um papel importante na progressão tumoral, uma vez que ela participa dos mecanismos de evasão tumoral, limitando a resposta imune induzida por interferon 1 (IFN-1) e diminuindo a atividade fagocítica de células *natural killers* e de macrófagos (SAGGU et al., 2022; XIE et al., 2022). Assim, este é mais um fator que exemplifica o potencial citoprotetor da SUMOilação, uma vez que a terapia antineoplásica visa aumentar a citotoxicidade a fim de causar a destruição de células cancerosas.

Por outro lado, a utilização de fármacos ou ferramentas farmacológicas que promovam o aumento da SUMOilação ainda é escassa e controversa. Apesar de existirem alguns estudos que explorem o potencial de inibidores de SENPs (KUMAR;

ZHANG, 2015), que promoveriam aumento da SUMOilação, não existem aplicações bem estabelecidas desta abordagem. Alguns outros compostos são apresentados como promotores de SUMOilação. Estudos sugerem que a atividade protetora da luteolina, um flavonoide, na isquemia-reperfusão cardíaca poderia estar associado ao aumento da SUMOilação de proteínas cardíacas (DU et al., 2018; HU et al., 2017). Efeitos semelhantes foram atribuídos ao zinco, uma vez que houve aumento da SUMOilação no tecido cardíaco de animais submetidos ao processo de isquemia-reperfusão e tratados com este suplemento (BIAN et al., 2019). Apesar dos autores demonstrarem o aumento da SUMOilação após os tratamentos citados, o mecanismo pelo o qual este fenômeno é visto não foi bem esclarecido. Portanto, não existem ferramentas farmacológicas que promovam inegavelmente um aumento significativo da SUMOilação. Assim, para avaliar os efeitos promovidos pelo aumento dos níveis de proteínas SUMOiladas é necessário utilizar ferramentas genéticas que induzam superexpressão da enzima conjugadora Ubc9 ou das proteínas SUMO.

Experimentos para induzir a superexpressão de SUMO1 e SUMO2 nas células HK-2 usando partículas de lentivírus foram realizados. A confirmação da eficácia da modificação é feita pela microscopia de fluorescência que mostrou um padrão bem diferente da distribuição de GFP nas células controle (uma expressão difusa) e uma fluorescência nuclear nas células LTV-SUMO1 e LTV-SUMO2. Esta distribuição é esperada, uma vez que a maioria dos alvos das proteínas SUMO são nucleares (JENTSCH; PSAKHYE, 2013). O aumento da SUMOilação teve um efeito protetor nas células, mitigando os danos causados pelo dano de OGD-reoxigenação. Estes resultados contrastam com um estudo que avaliou os efeitos da superexpressão e do *knockdown* de SENP1 em células renais (WANG et al., 2022). Nesse estudo, SENP1 pareceu proteger as células HK-2 que foram submetidas ao tratamento com cisplatina. No entanto, é preciso ressaltar que os modelos de insultos utilizados são diferentes, sendo que Wang e colaboradores empregaram um modelo de lesão renal por fármaco, enquanto este trabalho utilizou um insulto por OGD. Além disso, a deSUMOilação é um processo muito mais específico, uma vez que existem 6 enzimas desconjugadoras, e os alvos específicos da SENP1 podem resultar em consequências diferentes quando comparado com aumentos nos níveis totais de SUMOilação.

De fato, é importante observar que o impacto da SUMOilação depende em grande parte das proteínas-alvo. Por exemplo, em casos de isquemia miocárdica local, observa-se SUMOilação em várias proteínas (CHEN et al., 2019). Como dito

anteriormente, a SUMOilação por SUMO2/3 da ATPase de cálcio do retículo sarcoendoplasmático cardíaco 2a (SERCA2a) induzida pela luteolina demonstrou efeitos protetores para o coração (DU et al., 2018). Por outro lado, a SUMOilação de SUMO1 do NaV<sub>1.5</sub> foi associada a efeitos pró-arrítmicos que representam riscos para o coração (PLANT et al., 2020). Portanto, o tipo de proteína SUMO e os alvos potencialmente envolvidos são cruciais, pois, em última análise, são estes aspectos que determinarão as consequências dessa modificação pós-traducional em um tecido.

Este estudo apresenta limitações que devem ser reconhecidas. Embora tenhamos demonstrado diferenças significativas na resposta renal aos danos e variações no perfil de SUMOilação renal, não conseguimos averiguar se existe uma relação causal entre estes eventos *in vivo*. Além disso, ainda não identificamos proteínas-alvo específicas, mas planejamos realizar análises de proteômica, com foco em potenciais alvos de SUMO2/3 em células renais submetidas ao dano de OGD-reoxigenação. Ademais, análises para elucidar a composição das bandas observadas em 45 kDa nos *Western blottings* de SUMO2/3 também serão realizadas. Estas análises nos darão indícios de quais proteínas estão sendo SUMO2/3-iladas no rim, ao combinar o peso molecular dos possíveis alvos com o peso molecular da SUMO2/3 (12 – 18 kDa). Um exemplo de potencial alvo é a proteína de choque térmico 27 (HSP27, ~27 kDa). A combinação dos pesos moleculares da SUMO2/3 e da HSP27 promoveria o aparecimento por volta da região de 40 - 50 kDa, sendo este um mecanismo a ser avaliado. Estudos anteriores mostraram que a HSP27 é alvo de SUMOilação por SUMO2/3 em outras condições, como o câncer, promovendo a proliferação e invasão celular (GE et al., 2017). Vale ressaltar que a HSP27 atua como uma proteína chaperona e antioxidante, desempenhando um papel na inibição da apoptose (VIDYASAGAR; WILSON; DJAMALI, 2012).

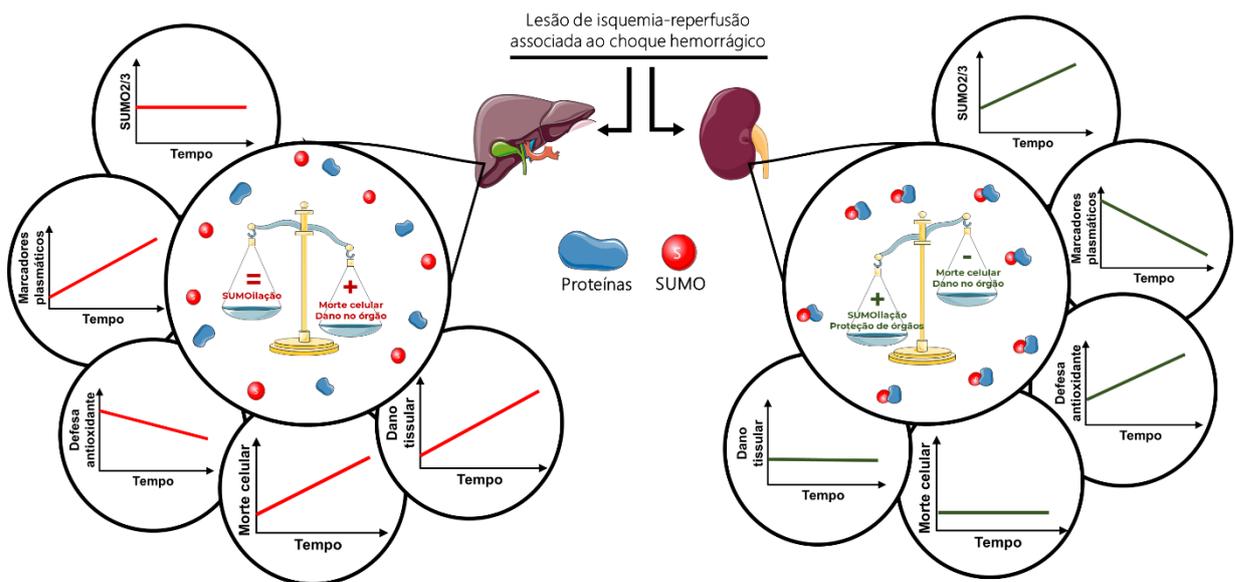
Outro possível alvo proteico passível de sofrer SUMO2/3-ilação é a anexina A1. A anexina A1 é uma proteína de 37 kDa que desempenha um papel importante anti-inflamatório e pró-resolução (CARON et al., 2013). Ela inibe a liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, e regula a adesão e a migração de células inflamatórias. Além disso, a anexina A1 está envolvida na regulação da apoptose, na modulação da resposta imune adaptativa e, por essas razões, tem sido estudada como um possível alvo para terapias que modulem resposta inflamatória geral, inclusive em modelos de CH (MA et al., 2019). A lisina 257 da anexina A1 fica em uma região que favorece a SUMOilação e isso parece regular

o processo de autofagia seletiva cerebral após isquemia cerebral por aumento da degradação da cinase inflamatória I $\kappa$ B (IKK $\alpha$ ). A combinação dos pesos moleculares da anexina A1 com o peso da SUMO2/3 também pode significar o aparecimento da banda em torno de 45 kDa nos *Western blottings*. Portanto, estes mecanismos aqui citados poderiam potencialmente explicar a proteção renal observada após o CH.

## 8 CONCLUSÃO

Em conclusão, embora tanto a deSUMOilação quanto a SUMOilação ocorram nos rins após CH, atribuímos a tolerância renal principalmente ao aumento da SUMOilação, especialmente por SUMO2/3. No fígado, onde há dano progressivo, a ausência de alterações na SUMOilação pode estar relacionada com os achados. Até onde sabemos, este estudo é o primeiro a avaliar detalhadamente a interação entre SUMOilação e CH, analisando o papel dessa modificação pós-traducional em dois órgãos diferentes. Nossos achados sugerem o potencial de manipulação terapêutica para aumentar a SUMOilação em outros órgãos como uma alternativa promissora de proteção aos órgãos de pacientes que sofreram lesões isquêmicas e CH.

Figura 19 – Resumo gráfico das conclusões



A SUMOilação total aumenta após o choque hemorrágico para conferir proteção celular nos rins. Estes órgãos são mais eficientes em promover essa modificação pós-traducional quando comparado com o fígado, assim, apresentam mecanismos de proteção mais eficientes contra o dano de isquemia-reperfusão.

Fonte: Elaborado pelo autor. Imagens obtidas do banco da ELSEVIER Medical Art®.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. Em: **Methods in enzymology**. [s.l: s.n.]. p. 121–126.
- AL-ATTAR, R.; STOREY, K. B. Suspended in time: Molecular responses to hibernation also promote longevity. **Experimental Gerontology**, v. 134, n. February, p. 110889, 2020.
- ANCKAR, J. et al. Inhibition of DNA Binding by Differential Sumoylation of Heat Shock Factors. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 3, p. 955–964, fev. 2006.
- ANTONELLI, M. et al. Application of SOFA score to trauma patients. **Intensive Care Medicine**, v. 25, n. 4, p. 389–394, 13 abr. 1999.
- AOKI, M. et al. Use of Vasopressor Increases the Risk of Mortality in Traumatic Hemorrhagic Shock. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 12, p. e1145–e1151, dez. 2018.
- APTE, U.; KRISHNAMURTHY, P. Detoxification Functions of the Liver. Em: **Molecular Pathology of Liver Diseases**. [s.l: s.n.]. p. 147–163.
- ÁVILA MARTÍNEZ, R. J. et al. Evolution and Complications of Chest Trauma. **Archivos de Bronconeumología (English Edition)**, v. 49, n. 5, p. 177–180, maio 2013.
- AWAD, A. S. et al. Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury. **Kidney International**, v. 75, n. 7, p. 689–698, abr. 2009.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–31, 2014.
- BAGSHAW, S. M. The long-term outcome after acute renal failure. **Current Opinion in Critical Care**, v. 12, n. 6, p. 561–566, dez. 2006.
- BAKER, J. G. The selectivity of  $\beta$ -adrenoceptor agonists at human  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- and  $\beta$ 3-adrenoceptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 5, p. 1048–1061, jul. 2010.
- BAKER, J. G. et al. Novel selective  $\beta$  1 -adrenoceptor antagonists for concomitant cardiovascular and respiratory disease. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 7, p. 3150–3166, 11 jul. 2017.
- BANSAL, V. et al. Hemorrhage is More Prevalent than Brain Injury in Early Trauma Deaths: The Golden Six Hours. **European Journal of Trauma and Emergency Surgery**, v. 35, n. 1, p. 26–30, 26 fev. 2009.

BARBEE, R. W.; REYNOLDS, P. S.; WARD, K. R. Assessing shock resuscitation strategies by oxygen debt repayment. **Shock**, v. 33, n. 2, p. 113–122, fev. 2010.

BARISIONE, C. et al. Renal Ischemia/Reperfusion Early Induces Myostatin and PCSK9 Expression in Rat Kidneys and HK-2 Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9884, 13 set. 2021.

BAWA-KHALFE, T. et al. Differential expression of SUMO-specific protease 7 variants regulates epithelial-mesenchymal transition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 43, p. 17466–17471, 23 out. 2012.

BAYER, P. et al. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. **Journal of Molecular Biology**, v. 280, n. 2, p. 275–286, jul. 1998.

BAYIR, H.; KAGAN, V. E. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis – there is nothing more practical than a good theory. **Critical Care**, v. 12, n. 1, p. 206, 2008.

BENSON, M. D. et al. SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 6, p. 1805–1810, fev. 2007.

BENSON, M.; IÑIGUEZ-LLUHÍ, J. A.; MARTENS, J. Sumo Modification of Ion Channels. Em: WILSON, V. (Ed.). **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer, Cham, 2017. p. 127–141.

BERNARDELLI, A. K. et al. Vasoplegia in sepsis depends on the vascular system, vasopressor, and time-point: a comparative evaluation in vessels from rats subjected to the cecal ligation puncture model. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 94, n. 11, p. 1227–1236, nov. 2016.

BERNIER-VILLAMOR, V. et al. Structural Basis for E2-Mediated SUMO Conjugation Revealed by a Complex between Ubiquitin-Conjugating Enzyme Ubc9 and RanGAP1. **Cell**, v. 108, n. 3, p. 345–356, fev. 2002.

BERNSTOCK, J. D. et al. SUMOylation in brain ischemia: Patterns, targets, and translational implications. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 38, n. 1, p. 5–16, 2018.

BEUVE, A. et al. Receptor guanylyl cyclase (RGC) family in GtoPdb v.2023.1. **IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE**, v. 2023, n. 1, 26 abr. 2023.

BIAN, X. et al. Zinc-Induced SUMOylation of Dynamin-Related Protein 1 Protects the Heart against Ischemia-Reperfusion Injury. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 1232146, 2019.

BICHET, D. et al. Vasopressin and oxytocin receptors in GtoPdb v.2023.1. **IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE**, v. 2023, n. 1, 26 abr. 2023.

BODDY, M. N. et al. PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. **Oncogene**, v. 13, n. 5, p. 971–82, 5 set. 1996.

BOFFA, J.-J.; ARENDSHORST, W. J. Maintenance of Renal Vascular Reactivity Contributes to Acute Renal Failure during Endotoxemic Shock. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 117–124, jan. 2005.

BOND, R. F.; JOHNSON, G. Cardiovascular adrenoreceptor function during compensatory and decompensatory hemorrhagic shock. **Circulatory shock**, v. 12, n. 1, p. 9–24, 1984.

BOND, R. F.; JOHNSON, G. Cardiovascular adrenoreceptor balance during hemorrhagic hypotension and shock. **Circulatory shock**, v. 16, n. 2, p. 155–64, 1985.

BONVENTRE, J. V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A specific and sensitive biomarker of kidney injury. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 68, n. sup241, p. 78–83, 8 jan. 2008.

BONVENTRE, J. V.; YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 11, p. 4210–4221, 1 nov. 2011.

BRASIL. **Quais são os tipos de doadores?** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/snt/doacao-de-orgaos/quais-sao-os-tipos-de-doador>>. Acesso em: 1 jul. 2023.

BROWN, L. M. et al. A Normal Platelet Count May Not Be Enough: The Impact of Admission Platelet Count on Mortality and Transfusion in Severely Injured Trauma Patients. **Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care**, v. 71, n. 2, p. S337–S342, ago. 2011.

CANNON, J. W. Hemorrhagic Shock. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 4, p. 370–379, 25 jan. 2018.

CARON, D. et al. Annexin A1 is regulated by domains cross-talk through post-translational phosphorylation and SUMOylation. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 10, p. 1962–1969, out. 2013.

CATCHPOLE, B. N.; HACKEL, D. B.; SIMEONE, F. A. Coronary and Peripheral Blood Flow in Experimental Hemorrhagic Hypotension Treated with L-Nor-Epinephrine. **Annals of Surgery**, v. 142, n. 3, p. 372–381, set. 1955.

CELEN, A. B.; SAHIN, U. Sumoylation on its 25th anniversary: mechanisms, pathology, and emerging concepts. **FEBS Journal**, v. 287, n. 15, p. 3110–3140, 2020.

CHANG, H. M.; YEH, E. T. H. Sumo: From bench to bedside. **Physiological Reviews**, v. 100, n. 4, p. 1599–1619, 2020.

CHANG, H. W. G.-J. W. S.-M. H. C.-R. Plasma endothelin level changes during hemorrhagic shock. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 35, n. 6, p. 825–833, dez. 1992.

CHANG, R. et al. Advances in the understanding of trauma-induced coagulopathy. **Blood**, v. 128, n. 8, p. 1043–1049, 25 ago. 2016.

CHAUDRY, I. H. Cellular mechanisms in shock and ischemia and their correction. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 245, n. 2, p. R117–R134, 1 ago. 1983.

CHEN, J. et al. Roles and mechanisms of SUMOylation on key proteins in myocardial ischemia/reperfusion injury. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 134, n. 6, p. 154–164, 2019.

CHEN, S. et al. Inflammatory factor-specific sumoylation regulates NF- $\kappa$ B signalling in glomerular cells from diabetic rats. **Inflammation Research**, v. 63, n. 1, p. 23–31, 31 jan. 2014.

CHEN, T.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. In Vitro Models of Ischemia-Reperfusion Injury. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, v. 4, n. 3, p. 142–153, 11 set. 2018.

CHIPMAN, A. M. et al. Contemporary resuscitation of hemorrhagic shock: What will the future hold? **The American Journal of Surgery**, v. 220, n. 3, p. 580–588, set. 2020.

CIMAROSTI, H. et al. Increased protein SUMOylation following focal cerebral ischemia. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 2, p. 280–289, fev. 2008.

CIMAROSTI, H. et al. Enhanced SUMOylation and SENP-1 Protein Levels following Oxygen and Glucose Deprivation in Neurones. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 17–22, 12 jan. 2012.

CLAPP, L. et al. Prostanoid receptors in GtoPdb v.2023.1. **IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE**, v. 2023, n. 1, 26 abr. 2023.

COELHO-SILVA, L.; STEPHENS, G. J.; CIMAROSTI, H. SUMOylation and calcium signalling: potential roles in the brain and beyond. **Neuronal Signaling**, v. 1, n. 3, 15 ago. 2017.

COHN, H. I. et al. Inhibition of vascular smooth muscle G protein-coupled receptor kinase 2 enhances  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptor constriction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, n. 4, p. H1695–H1704, out. 2008.

COLLARD, C. D.; GELMAN, S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. **Anesthesiology**, v. 94, n. 6, p. 1133–1138, 1 jun. 2001.

CONTRERAS, J. L. et al. Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice. **Surgery**, v. 136, n. 2, p. 390–400, ago. 2004.

COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 95, p. 27–42, jun. 2016.

CURRIN, R. T. et al. Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 2, p. 207–210, fev. 1991.

DAI, W. et al. Different Effects of Volatile and Nonvolatile Anesthetic Agents on Long-Term Survival in an Experimental Model of Hemorrhagic Shock. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 4, p. 346–353, 15 jul. 2020.

DATWYLER, A. L. et al. SUMO2/3 Conjugation is an Endogenous Neuroprotective Mechanism. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 31, n. 11, p. 2152–2159, 24 nov. 2011.

DE DUVE, C.; BAUDHUIN, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). **Physiological Reviews**, v. 46, n. 2, p. 323–357, abr. 1966.

DE GASPARO, M. et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 3, p. 415–72, set. 2000.

DEEB, A.-P. et al. Optimal Prehospital Crystalloid Resuscitation Volume in Trauma Patients at Risk for Hemorrhagic Shock. **Journal of the American College of Surgeons**, v. Ahead of print, 28 mar. 2023.

DEISSEROTH, A.; DOUNCE, A. L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 319–375, jul. 1970.

DEITCH, E. A. et al. Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology, and intestinal permeability in conventional and antibiotic-decontaminated rats. **Critical Care Medicine**, v. 18, n. 5, p. 529–536, maio 1990.

DEMETRIADES, D. et al. Trauma fatalities. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 198, n. 1, p. 20–26, jan. 2004.

DOMINGUES, P. et al. Global Reprogramming of Host SUMOylation during Influenza Virus Infection. **Cell Reports**, v. 13, n. 7, p. 1467–1480, nov. 2015.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Em: [s.l: s.n.]. p. 421–431.

DU, Y. et al. Luteolin Modulates SERCA2a Leading to Attenuation of Myocardial Ischemia/ Reperfusion Injury via Sumoylation at Lysine 585 in Mice. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 45, n. 3, p. 883–898, 2018.

DUNBERRY-POISSANT, S. et al. Fluid sparing and norepinephrine use in a rat model of resuscitated haemorrhagic shock: end-organ impact. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 6, n. 1, 2018.

DURHAM, R. M. et al. Multiple Organ Failure in Trauma Patients. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 55, n. 4, p. 608–616, out. 2003.

DUTTON, R. P. et al. Trauma Mortality in Mature Trauma Systems: Are We Doing Better? An Analysis of Trauma Mortality Patterns, 1997–2008. **Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care**, v. 69, n. 3, p. 620–626, set. 2010.

EASTRIDGE, B. J.; HOLCOMB, J. B.; SHACKELFORD, S. Outcomes of traumatic hemorrhagic shock and the epidemiology of preventable death from injury. **Transfusion**, v. 59, n. S2, p. 1423–1428, 13 abr. 2019.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, maio 1959.

FLOTHO, A.; MELCHIOR, F. Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 357–385, 2 jun. 2013.

FOLZ, H. et al. SUMOylation of the nuclear pore complex basket is involved in sensing cellular stresses. **Journal of Cell Science**, 1 jan. 2019.

FREYER, D.; HARMS, C. Kinetic Lactate Dehydrogenase Assay for Detection of Cell Damage in Primary Neuronal Cell Cultures. **BIO-PROTOCOL**, v. 7, n. 11, 2017.

FRÖHLICH, M. et al. Epidemiology and risk factors of multiple-organ failure after multiple trauma. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 76, n. 4, p. 921–928, abr. 2014.

FÜLÖP, A. et al. Experimental Models of Hemorrhagic Shock: A Review. **European Surgical Research**, v. 50, n. 2, p. 57–70, 2013.

GAINER, J. L.; LIPA, M. J.; FICENEC, M. C. Hemorrhagic shock in rats. **Laboratory animal science**, v. 45, n. 2, p. 169–72, abr. 1995.

GAO, C. et al. The Role of Ubiquitination and Sumoylation in Diabetic Nephropathy. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

GAO, Y. et al. Effects of farnesoid-X-receptor SUMOylation mutation on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. **Experimental cell research**, v. 371, n. 2, p. 301–310, out. 2018.

GE, H. et al. SUMOylation of HSP27 by small ubiquitin-like modifier 2/3 promotes proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Biology & Therapy**, v. 18, n. 8, p. 552–559, 3 ago. 2017.

GOLEBIEWSKI, F. et al. System-Wide Changes to SUMO Modifications in Response to Heat Shock. **Science Signaling**, v. 2, n. 72, 26 maio 2009.

GONG, L.; YEH, E. T. H. Characterization of a Family of Nucleolar SUMO-specific Proteases with Preference for SUMO-2 or SUMO-3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 23, p. 15869–15877, jun. 2006.

GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. **Redox Biology**, v. 6, p. 524–551, dez. 2015.

GU, J. et al. SENP1 protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via a HIF1 $\alpha$ -dependent pathway. **Cardiovascular research**, v. 104, n. 1, p. 83–92, out. 2014.

GUERCI, P. et al. Effect of Polyethylene-glycolated Carboxyhemoglobin on Renal Microcirculation in a Rat Model of Hemorrhagic Shock. **Anesthesiology**, v. 131, n. 5, p. 1110–1124, 1 nov. 2019.

GUO, B.; SHARROCKS, A. D. Extracellular Signal-Regulated Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Initiates a Dynamic Interplay between Sumoylation

and Ubiquitination To Regulate the Activity of the Transcriptional Activator PEA3. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 11, p. 3204–3218, 1 jun. 2009.

GUO, C. et al. SUMOylation occurs in acute kidney injury and plays a cytoprotective role. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1852, n. 3, p. 482–489, mar. 2015.

GUO, C.; HENLEY, J. M. Wrestling with stress: Roles of protein SUMOylation and deSUMOylation in cell stress response. **IUBMB Life**, v. 66, n. 2, p. 71–77, fev. 2014.

GUO, D. et al. A functional variant of SUMO4, a new I $\kappa$ B $\alpha$  modifier, is associated with type 1 diabetes. **Nature Genetics**, v. 36, n. 8, p. 837–841, 1 ago. 2004.

GUPTA, D. et al. SUMOylation in fungi: A potential target for intervention. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 3484–3493, 2020.

GUTIERREZ, G.; REINES, H. D.; WULF-GUTIERREZ, M. E. Clinical Review: Hemorrhagic Shock. **Critical Care**, v. 8, n. 5, p. 373, 2004.

GUYTON, A. C. The relationship of cardiac output and arterial pressure control. **Circulation**, v. 64, n. 6, p. 1079–1088, dez. 1981.

HALJAMÄE, H. Organ specific metabolic changes in shock. **Progress in clinical and biological research**, v. 264, p. 17–26, 1988.

HAMPTON, M.; NELSON, B. T.; ANDREWS, M. T. Circulation and metabolic rates in a natural hibernator: an integrative physiological model. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 299, n. 6, p. R1478–R1488, dez. 2010.

HARMS, C. et al. Phosphatidylinositol 3-Akt-Kinase-Dependent Phosphorylation of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> as a Novel Mechanism of Neuroprotection by Glucocorticoids. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 17, p. 4562–4571, 25 abr. 2007.

HOFFMAN, M.; CICHON, L. J. H. Practical coagulation for the blood banker. **Transfusion**, v. 53, n. 7, p. 1594–1602, jul. 2013.

HOSTE, E. A. J.; SCHURGERS, M. Epidemiology of acute kidney injury: How big is the problem? **Critical Care Medicine**, v. 36, n. Suppl, p. S146–S151, abr. 2008.

HU, W. et al. Luteolin improves cardiac dysfunction in heart failure rats by regulating sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 2a. **Scientific reports**, v. 7, p. 41017, jan. 2017.

HUANG, W. et al. High glucose induces activation of NF- $\kappa$ B inflammatory signaling through I $\kappa$ B $\alpha$  sumoylation in rat mesangial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 438, n. 3, p. 568–574, ago. 2013.

HUTCHINGS, L. et al. Defining multiple organ failure after major trauma: A comparison of the Denver, Sequential Organ Failure Assessment and Marshall scoring systems. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 82, n. 3, p. 534–541, mar. 2017.

HUTCHINGS, S. D. et al. Microcirculatory Impairment Is Associated With Multiple Organ Dysfunction Following Traumatic Hemorrhagic Shock. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 9, p. e889–e896, set. 2018.

IMOTO, S. et al. Sumoylation of Smad3 stimulates its nuclear export during PIASy-mediated suppression of TGF- $\beta$  signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 370, n. 2, p. 359–365, maio 2008.

IPEA. **Acidentes de trânsito nas rodovias federais brasileiras**. Disponível em:

<[https://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/150922\\_relatorio\\_acidentes\\_transito.pdf](https://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/150922_relatorio_acidentes_transito.pdf)>. Acesso em: 1 jul. 2023.

JAKSCHIK, B. A. et al. Profile of Circulating Vasoactive Substances in Hemorrhagic Shock and Their Pharmacologic Manipulation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 54, n. 4, p. 842–852, 1 out. 1974.

JANSEN, N. S.; VERTEGAAL, A. C. O. A Chain of Events: Regulating Target Proteins by SUMO Polymers. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 113–123, 2021.

JENTSCH, S.; PSAKHYE, I. Control of Nuclear Activities by Substrate-Selective and Protein-Group SUMOylation. **Annual Review of Genetics**, v. 47, n. 1, p. 167–186, 23 nov. 2013.

JIAN, B. et al. Activation of endoplasmic reticulum stress response following trauma-hemorrhage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1782, n. 11, p. 621–626, nov. 2008.

JIANG, M.; CHIU, S.-Y.; HSU, W. SUMO-specific protease 2 in Mdm2-mediated regulation of p53. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 6, p. 1005–1015, 24 jun. 2011.

KAJIHARA, H.; HIRATA, S.; MIYOSHI, N. Changes in blood catecholamine levels and ultrastructure of dog adrenal medullary cells during hemorrhagic shock. **Virchows Archiv B Cell Pathology**, v. 23, n. 1, p. 1, dez. 1977.

KALOGERIS, T. et al. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. Em: [s.l: s.n.]. p. 229–317.

KAUVAR, D. S.; LEFERING, R.; WADE, C. E. Impact of Hemorrhage on Trauma Outcome: An Overview of Epidemiology, Clinical Presentations, and Therapeutic Considerations. **Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care**, v. 60, n. 6, p. S3–S11, jun. 2006.

KEEL, M.; TRENTZ, O. Pathophysiology of polytrauma. **Injury**, v. 36, n. 6, p. 691–709, jun. 2005.

KMIECIK, S. W. et al. Heat shock transcription factor 1 is SUMOylated in the activated trimeric state. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, p. 100324, jan. 2021.

KOLLI, N. et al. Distribution and paralogue specificity of mammalian deSUMOylating enzymes. **Biochemical Journal**, v. 430, n. 2, p. 335–344, 1 set. 2010.

KOO, A.; LIANG, I. Y. S. Blood flow in hepatic sinusoids in experimental hemorrhagic shock in the rat. **Microvascular Research**, v. 13, n. 3, p. 315–325, maio 1977.

KOVÀCH, A. G. B.; TAKÀCS, L. Response of the Vascular System to Sympathetic Stimuli during Shock. **Nature**, v. 171, n. 4349, p. 433–434, mar. 1953.

KREISBERG, J. I. et al. Effects of transient hypotension on the structure and function of rat kidney. **Virchows Archiv B Cell Pathology**, v. 22, n. 1, p. 121–133, dez. 1976.

KUMAR, A.; ZHANG, K. Y. J. Advances in the development of SUMO specific protease (SENP) inhibitors. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 204–211, 2015.

KUNZ, K.; PILLER, T.; MÜLLER, S. SUMO-specific proteases and isopeptidases of the SENP family at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 6, 15 mar. 2018.

KUO, K.; PALMER, L. Pathophysiology of hemorrhagic shock. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 32, n. S1, p. 22–31, 19 jan. 2022.

LAMANNA, J. C. Hypoxia/Ischemia and the pH Paradox. Em: [s.l: s.n.]. p. 283–292.

LANGSTON, S. P. et al. Discovery of TAK-981, a First-in-Class Inhibitor of SUMO-Activating Enzyme for the Treatment of Cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 2501–2520, 11 mar. 2021.

LEE, Y. et al. Protein SUMOylation is Massively Increased in Hibernation Torpor and is Critical for the Cytoprotection Provided by Ischemic Preconditioning and Hypothermia in SHSY5Y Cells. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 950–962, 6 maio 2007.

LEI, Y. et al. Beneficial effect of cyclosporine A on traumatic hemorrhagic shock. **Journal of Surgical Research**, v. 195, n. 2, p. 529–540, 2015.

LENTSCK, M. H.; SATO, A. P. S.; MATHIAS, T. A. DE F. Epidemiological overview – 18 years of ICU hospitalization due to trauma in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 53, p. 83, 27 set. 2019.

LEUNG, C. H. et al. Remote Ischemic Conditioning Prevents Lung and Liver Injury After Hemorrhagic Shock/Resuscitation. **Annals of Surgery**, v. 261, n. 6, p. 1215–1225, jun. 2015.

LEVY, B. et al. Vasoplegia treatments: the past, the present, and the future. **Critical Care**, v. 22, n. 1, p. 52, 27 dez. 2018.

LI, X. et al. Annexin-A1 SUMOylation regulates microglial polarization after cerebral ischemia by modulating IKK $\alpha$  stability via selective autophagy. **Science Advances**, v. 7, n. 4, 2021.

LIANG, Y.-C. et al. SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 26509, 23 maio 2016.

LIN, B. et al. Cannabidiol alleviates hemorrhagic shock-induced neural apoptosis in rats by inducing autophagy through activation of the PI3K/AKT pathway. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 13 abr. 2020.

LIU, B. et al. The Ligase PIAS1 Restricts Natural Regulatory T Cell Differentiation by Epigenetic Repression. **Science**, v. 330, n. 6003, p. 521–525, 22 out. 2010.

LIU, C. et al. Gastrin Attenuates Renal Ischemia/Reperfusion Injury by a PI3K/Akt/Bad-Mediated Anti-apoptosis Signaling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 6 nov. 2020.

LIU, F.-C.; LIU, F.-W.; YU, H.-P. Ondansetron attenuates hepatic injury via p38 MAPK-dependent pathway in a rat haemorrhagic shock model. **Resuscitation**, v. 82, n. 3, p. 335–340, mar. 2011.

LOPEZ-GIACOMAN, S. Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. **World Journal of Nephrology**, v. 4, n. 1, p. 57, 2015.

LUNDGAARD-HANSEN, P. Oxygen Supply and Anaerobic Metabolism of the Heart in Experimental Hemorrhagic Shock. **Annals of Surgery**, v. 163, n. 1, p. 10–20, jan. 1966.

LUO, J. et al. Receptor Trafficking and the Regulation of Synaptic Plasticity by SUMO. **NeuroMolecular Medicine**, v. 15, n. 4, p. 692–706, 11 dez. 2013.

MA, Q. et al. Annexin A1 Bioactive Peptide Promotes Resolution of Neuroinflammation in a Rat Model of Exsanguinating Cardiac Arrest Treated by Emergency Preservation and Resuscitation. **Frontiers in neuroscience**, v. 13, p. 608, 2019.

MABB, A. M.; MIYAMOTO, S. SUMO and NF- $\kappa$ B ties. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 15, p. 1979–1996, 29 ago. 2007.

MAHAJAN, R. et al. A Small Ubiquitin-Related Polypeptide Involved in Targeting RanGAP1 to Nuclear Pore Complex Protein RanBP2. **Cell**, v. 88, n. 1, p. 97–107, jan. 1997.

MAJDE, J. A. Animal Models for Hemorrhage and Resuscitation Research. **Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care**, v. 54, n. 5, p. S100–S105, maio 2003.

MANGER, W. M. et al. Plasma Concentration of Epinephrine and Norepinephrine in Hemorrhagic and Anaphylactic Shock. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 190, n. 2, p. 310–316, 1 ago. 1957.

MANN, D. V. et al. Superiority of Blood Over Saline Resuscitation From Hemorrhagic Shock: A <sup>31</sup>P Magnetic Resonance Spectroscopy Study. **Annals of Surgery**, v. 226, n. 5, p. 653–661, nov. 1997.

MANNERVIK, B. Measurement of Glutathione Reductase Activity. **Current Protocols in Toxicology**, v. 00, n. 1, maio 1999.

MATUNIS, M. J.; COUTAVAS, E.; BLOBEL, G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. **Journal of Cell Biology**, v. 135, n. 6, p. 1457–1470, 15 dez. 1996.

MCGILL, M. R. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. **EXCLI journal**, v. 15, p. 817–828, 2016.

MELCHIOR, F. SUMO—Nonclassical Ubiquitin. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, n. 1, p. 591–626, nov. 2000.

MELLANDER, S.; LEWIS, D. H. Effect of Hemorrhagic Shock on the Reactivity of Resistance and Capacitance Vessels and on Capillary Filtration Transfer in Cat Skeletal Muscle. **Circulation Research**, v. 13, n. 2, p. 105–118, ago. 1963.

MELUH, P. B.; KOSHLAND, D. Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. **Molecular Biology of the Cell**, v. 6, n. 7, p. 793–807, jul. 1995.

MENG, Q.; LIU, H.; WANG, J. Protective effects of polydatin on HK-2 cells against oxygen-glucose deprivation/re-oxygenation-induced injury by regulating Sonic hedgehog through PI3K/Akt signaling pathway. **Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology**, v. 31, n. 11, p. 1452–7, nov. 2015.

METHVEN, L. et al. The alpha 1B/D-adrenoceptor knockout mouse permits isolation of the vascular alpha 1A-adrenoceptor and elucidates its relationship to the other subtypes. **British journal of pharmacology**, v. 158, n. 1, p. 209–24, set. 2009.

METHVEN, L.; SIMPSON, P. C.; MCGRATH, J. C. Alpha1A/B-knockout mice explain the native alpha1D-adrenoceptor's role in vasoconstriction and show that its location is independent of the other alpha1-subtypes. **British journal of pharmacology**, v. 158, n. 7, p. 1663–75, dez. 2009.

MIDDLETON, S. THE EFFECTS OF RENIN AND ANGIOTONIN DURING HEMORRHAGIC HYPOTENSION AND SHOCK. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 141, n. 1, p. 132–137, 1 mar. 1944.

MINEI, J. P. et al. The changing pattern and implications of multiple organ failure after blunt injury with hemorrhagic shock\*. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 4, p. 1129–1135, abr. 2012.

MIRZAYAN, M. J. et al. Histopathological features of the brain, liver, kidney and spleen following an innovative polytrauma model of the mouse. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 3, p. 133–139, mar. 2012.

MIZOCK, B. A. The Multiple Organ Dysfunction Syndrome. **Disease-a-Month**, v. 55, n. 8, p. 476–526, ago. 2009.

MOORE, L. et al. Evaluation of the Long-term Trend in Mortality from Injury in a Mature Inclusive Trauma System. **World Journal of Surgery**, v. 34, n. 9, p. 2069–2075, 23 set. 2010.

MORRISON, J. J. et al. Injury pattern and mortality of noncompressible torso hemorrhage in UK combat casualties. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 75, n. 2, p. S263–S268, ago. 2013.

MOSSESSOVA, E.; LIMA, C. D. Ulp1-SUMO Crystal Structure and Genetic Analysis Reveal Conserved Interactions and a Regulatory Element Essential for Cell Growth in Yeast. **Molecular Cell**, v. 5, n. 5, p. 865–876, maio 2000.

MÓZES, T.; WIESZT, E. Intestinal and arterial plasma thromboxane and prostacyclin levels in shock: Effects of indomethacin. **Journal of Surgical Research**, v. 47, n. 6, p. 482–486, dez. 1989.

NAKAGAWA, K.; YOKOSAWA, H. PIAS3 induces SUMO-1 modification and transcriptional repression of IRF-1. **FEBS Letters**, v. 530, n. 1–3, p. 204–208, 23 out. 2002.

NAPOLITANO, L. M. et al. Tranexamic acid in trauma. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 74, n. 6, p. 1575–1586, jun. 2013.

NAYAK, A.; MÜLLER, S. SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond. **Genome Biology**, v. 15, n. 7, p. 422, 31 jul. 2014.

NEUTZE, J.; WYLER, F.; RUDOLPH, A. Changes in distribution of cardiac output after hemorrhage in rabbits. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 215, n. 4, p. 857–864, 1 out. 1968.

OBERT, D. P.; WOLPERT, A. K.; KORFF, S. Modulation of Endoplasmic Reticulum Stress Influences Ischemia-Reperfusion Injury After Hemorrhagic Shock. **Shock**, v. 52, n. 5, p. e76–e84, nov. 2019.

OKURA, T. et al. Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 10, p. 4277–4281, 15 nov. 1996.

OLIVEIRA, F. R. M. B. et al. SUMOylation in peripheral tissues under low perfusion-related pathological states. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 123, n. 7, p. 1133–1147, 2 jul. 2022.

OMS. **Injuries and violence**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/injuries-and-violence>>. Acesso em: 1 jul. 2023.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, D. N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 3, p. 537–550, fev. 1999.

PAPA, L. et al. Assessing Effectiveness of a Mature Trauma System: Association of Trauma Center Presence with Lower Injury Mortality Rate. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 61, n. 2, p. 261–267, ago. 2006.

PARKS, D. A.; GRANGER, D. N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 250, n. 6, p. G749–G753, 1 jun. 1986.

PERCIE DU SERT, N. et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research\*. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 40, n. 9, p. 1769–1777, 2020.

PICHLER, A. et al. The Nucleoporin RanBP2 Has SUMO1 E3 Ligase Activity. **Cell**, v. 108, n. 1, p. 109–120, jan. 2002.

PICHLER, A. et al. SUMO conjugation – a mechanistic view. **Biomolecular Concepts**, v. 8, n. 1, p. 13–36, 1 mar. 2017.

PLANT, L. et al. Hypoxia Produces Pro-arrhythmic Late Sodium Current in Cardiac Myocytes by SUMOylation of NaV1.5 Channels. **Cell Reports**, v. 30, n. 7, p. 2225- 2236.e4, 2020.

PRIANTE, G. et al. Cell Death in the Kidney. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3598, 23 jul. 2019.

PROBST, C. et al. 30 years of polytrauma care: An analysis of the change in strategies and results of 4849 cases treated at a single institution. **Injury**, v. 40, n. 1, p. 77–83, jan. 2009.

PROCTOR, J. L. et al. Hyperoxic resuscitation improves survival but worsens neurologic outcome in a rat polytrauma model of traumatic brain injury plus hemorrhagic shock. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 79, n. 4, p. S101–S109, out. 2015.

RANA, M. W. et al. Protective Effects of Preheparinization on the Microvasculature During and After Hemorrhagic Shock. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 32, n. 4, p. 420–426, abr. 1992.

RATURI, A.; MUTUS, B. Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive

fluorescent assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 1, p. 62–70, jul. 2007.

RAWLINGS, N. et al. Protective role of the deSUMOylating enzyme SENP3 in myocardial ischemia-reperfusion injury. **PloS one**, v. 14, n. 4, p. e0213331, 2019.

REITER, A. et al. Improving Risk Adjustment in Critically Ill Trauma Patients: The TRISS-SAPS Score. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 57, n. 2, p. 375–380, ago. 2004.

RIBAS, C. et al. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: Role of GRKs in GPCR regulation and signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1768, n. 4, p. 913–922, abr. 2007.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 253–266, out. 2010.

ROSALES, T. O. et al. Dynamics of GRK2 in the kidney: a putative mechanism for sepsis-associated kidney injury. **Clinical Science**, v. 135, n. 20, p. 2341–2356, 29 out. 2021.

SAGGU, G. et al. Subasumstat, a first-in-class inhibitor of SUMO-activating enzyme, demonstrates dose-dependent target engagement and SUMOylation inhibition, leading to rapid activation of innate and adaptive immune responses in the dose escalation portion of a phase 1/2 clinical study. **European Journal of Cancer**, v. 174, p. S125–S126, out. 2022.

SAIKUMAR, P. et al. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. **Oncogene**, v. 17, n. 25, p. 3341–3349, 24 dez. 1998.

SAITOH, H.; HINCHEY, J. Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 9, p. 6252–6258, mar. 2000.

SALLAIS, J. et al. Factor inhibiting HIF1-A novel target of SUMOylation in the human placenta. **Oncotarget**, v. 8, n. 69, p. 114002–114018, dez. 2017.

SAPETSCHNIG, A. et al. Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 19, p. 5206–5215, 1 out. 2002.

SAUAIA, A. M. F. A. ; M. E. E. ; M. K. S. ; B. R. ; R. R. A. ; P. P. T. Epidemiology of Trauma Deaths A Reassessment. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 38, n. 2, p. 185–193, fev. 1995.

SCHNEIDER, P.; TSCHOPP, J. Apoptosis induced by death receptors. *Em: [s.l: s.n.].* p. 281–286.

SCHROEDL, C. et al. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 $\alpha$  requires mitochondrial reactive oxygen species. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 5, p. L922–L931, 1 nov. 2002.

SCHUMACKER, P. T. Hypoxia, anoxia, and O<sub>2</sub> sensing: the search continues. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 5, p. L918–L921, 1 nov. 2002.

SEIFERT, A. et al. Proteotoxic stress reprograms the chromatin landscape of SUMO modification. **Science Signaling**, v. 8, n. 384, 7 jul. 2015.

SHARMA, A.; MUCINO, M. J.; RONCO, C. Renal Functional Reserve and Renal Recovery after Acute Kidney Injury. **Nephron Clinical Practice**, v. 127, n. 1–4, p. 94–100, 24 set. 2014.

SHEN, Z. et al. UBL1, a Human Ubiquitin-like Protein Associating with Human RAD51/RAD52 Proteins. **Genomics**, v. 36, n. 2, p. 271–279, set. 1996.

SILVEIRINHA, V.; STEPHENS, G. J.; CIMAROSTI, H. Molecular targets underlying SUMO-mediated neuroprotection in brain ischemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 127, n. 5, p. 580–591, dez. 2013.

SORDI, R. et al. Inhibition of I $\kappa$ B kinase attenuates the organ injury and dysfunction associated with hemorrhagic shock. **Molecular Medicine**, v. 21, 2015.

SORDI, R. et al. Neuronal Nitric Oxide Synthase is Involved in Vascular Hyporeactivity and Multiple Organ Dysfunction Associated with Hemorrhagic Shock. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 45, n. 5, p. 525–533, maio 2016.

SPANN, A. P. et al. The Effect of Hematocrit on Platelet Adhesion: Experiments and Simulations. **Biophysical Journal**, v. 111, n. 3, p. 577–588, ago. 2016.

STRIJDOM, H.; GENADE, S.; LOCHNER, A. Nitric Oxide Synthase (NOS) Does Not Contribute to Simulated Ischaemic Preconditioning in an Isolated Rat Cardiomyocyte Model. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 18, n. 2, p. 99–112, mar. 2004.

SU, H.-L.; LI, S. S.-L. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. **Gene**, v. 296, n. 1–2, p. 65–73, ago. 2002.

SUN, G. et al. Selective-cerebral-hypothermia-induced neuroprotection against-focal cerebral ischemia/reperfusion injury is associated with an increase in SUMO2/3 conjugation. **Brain Research**, v. 1756, n. January, p. 147311, 2021.

SUZUKI, C. et al. Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 368, n. 1, p. 100–106, mar. 2008.

SWANK, G. M.; DEITCH, E. A. Role of the Gut in Multiple Organ Failure: Bacterial Translocation and Permeability Changes. **World Journal of Surgery**, v. 20, n. 4, p. 411–417, 1 maio 1996.

TASCA, C. I.; DAL-CIM, T.; CIMAROSTI, H. In Vitro Oxygen-Glucose Deprivation to Study Ischemic Cell Death. Em: **Neuronal cell death**. [s.l.: s.n.]. v. 1254.

TEOH, N. C.; FARRELL, G. C. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 8, p. 891–902, ago. 2003.

THIEMERMANN, C. et al. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 1, p. 267–271, jan. 1993.

THORIN, E.; WEBB, D. J. Endothelium-derived endothelin-1. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 459, n. 6, p. 951–8, maio 2010.

TIRAPELLI, L. F. et al. Comparison of Two Models for Evaluation Histopathology of Experimental Renal Ischemia. **Transplantation Proceedings**, v. 41, n. 10, p. 4083–4087, dez. 2009.

TRAJANO, A. D.; PEREIRA, B. M.; FRAGA, G. P. Epidemiology of in-hospital trauma deaths in a Brazilian university hospital. **BMC Emergency Medicine**, v. 14, n. 1, p. 22, 31 dez. 2014.

TRAN, A. et al. Permissive hypotension versus conventional resuscitation strategies in adult trauma patients with hemorrhagic shock: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 84, n. 5, p. 802–808, maio 2018.

TREMOLEDA, J. L. et al. Modeling Acute Traumatic Hemorrhagic Shock Injury: Challenges and Guidelines for Preclinical Studies. **Shock**, v. 48, n. 6, p. 610–623, dez. 2017.

ULRICH, K.; JAKOB, U. The role of thiols in antioxidant systems. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 140, p. 14–27, ago. 2019.

VAN BUREN, M. C. et al. Long-Term Kidney and Maternal Outcomes After Pregnancy in Living Kidney Donors. **Transplant International**, v. 36, 28 jun. 2023.

VARGHESE, G. M. Predictors of multi-organ dysfunction in heatstroke. **Emergency Medicine Journal**, v. 22, n. 3, p. 185–187, 1 mar. 2005.

VESELL, E. S.; FELDMAN, M. P.; FRANK, E. D. Plasma Lactic Dehydrogenase Activity in Experimental Hemorrhagic Shock. **Experimental Biology and Medicine**, v. 101, n. 4, p. 644–648, 1 ago. 1959.

VIDYASAGAR, A.; WILSON, N. A.; DJAMALI, A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 5, n. 1, p. 7, 7 dez. 2012.

VOGEL, J. A. et al. Prediction of postinjury multiple-organ failure in the emergency department. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 76, n. 1, p. 140–145, jan. 2014.

WANG, L. et al. SENP1 protects cisplatin-induced AKI by attenuating apoptosis through regulation of HIF-1 $\alpha$ . **Experimental Cell Research**, v. 419, n. 1, p. 113281, out. 2022.

WASIK, U.; FILIPEK, A. Non-nuclear function of sumoylated proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 12, p. 2878–2885, dez. 2014.

WEGER, S.; HAMMER, E.; HEILBRONN, R. Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. **FEBS Letters**, v. 579, n. 22, p. 5007–5012, 12 set. 2005.

WENDEL, A. [44] Glutathione peroxidase. Em: [s.l: s.n.]. p. 325–333.

WIGGERS, C. J.; WERLE, J. M. Cardiac and peripheral resistance factors as determinants of circulatory failure in hemorrhagic shock. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 136, n. 3, p. 421–432, 1 maio 1942.

WILKINSON, K. A.; HENLEY, J. M. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. **Biochemical Journal**, v. 428, n. 2, p. 133–145, 1 jun. 2010.

WILKINSON, K. A.; NAKAMURA, Y.; HENLEY, J. M. Targets and consequences of protein SUMOylation in neurons. **Brain Research Reviews**, v. 64, n. 1, p. 195–212, set. 2010.

WOHLAUER, M. V. et al. Early Platelet Dysfunction: An Unrecognized Role in the Acute Coagulopathy of Trauma. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 214, n. 5, p. 739–746, maio 2012.

WOLPERT, A. et al. Hepatic topographical changes of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response signaling after hemorrhagic shock and reperfusion. **Journal of Surgical Research**, v. 231, p. 278–289, nov. 2018.

WRBA, L. et al. Evaluation of gut-blood barrier dysfunction in various models of trauma, hemorrhagic shock, and burn injury. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 83, n. 5, p. 944–953, 2017.

WU, M.-Y. et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 1650–1667, 2018.

WU, Q. et al. SUMOylation Landscape of Renal Cortical Collecting Duct Cells. **Journal of Proteome Research**, v. 18, n. 10, p. 3640–3648, 2019.

WU, R. et al. Human vasoactive hormone adrenomedullin and its binding protein rescue experimental animals from shock. **Peptides**, v. 29, n. 7, p. 1223–1230, jul. 2008.

XIAO, Q. et al. Ubc9 Attenuates Myocardial Ischemic Injury Through Accelerating Autophagic Flux. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 561306, 2020.

XIE, B. et al. PIAS1 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by stimulating PPAR $\gamma$  SUMOylation. **BMC cell biology**, v. 19, n. 1, p. 24, nov. 2018.

XIE, Y. et al. Role and Mechanisms of Tumor-Associated Macrophages in Hematological Malignancies. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 7 jul. 2022.

YANG, W. et al. Analysis of Oxygen/Glucose-Deprivation-Induced Changes in SUMO3 Conjugation Using SILAC-Based Quantitative Proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 2, p. 1108–1117, 3 fev. 2012.

YANG, W.-S. et al. In Vitro SUMOylation Assay to Study SUMO E3 Ligase Activity. **Journal of Visualized Experiments**, n. 131, p. ee56629, 29 jan. 2018.

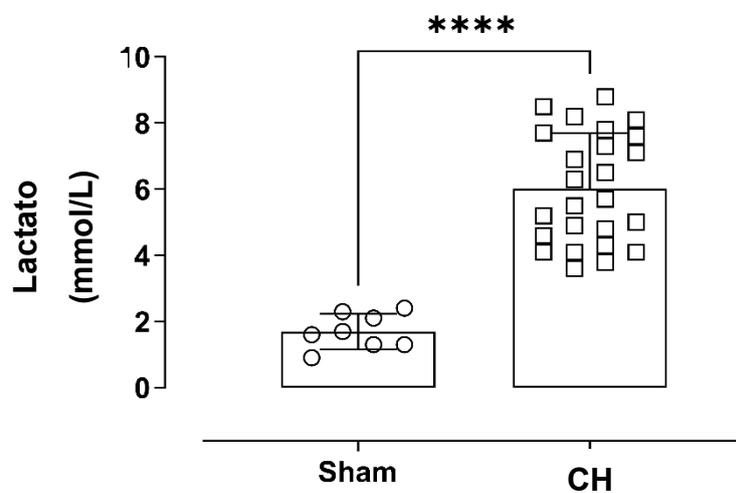
YILMAZ, E. N. et al. The Effect of Inhibition of Renin-Angiotensin System by Valsartan during Hypovolemic Shock and Low Flow Sigmoidal Ischaemia in Pigs. **Cardiovascular Surgery**, v. 11, n. 1, p. 45–51, 27 fev. 2003.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5944–5972, 12 out. 2011.

ZHANG, L. M. et al. Carbon monoxide-releasing molecule-3 protects against cortical pyroptosis induced by hemorrhagic shock and resuscitation via mitochondrial regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, 2019.

ZHANG, Q. et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 104–107, mar. 2010.

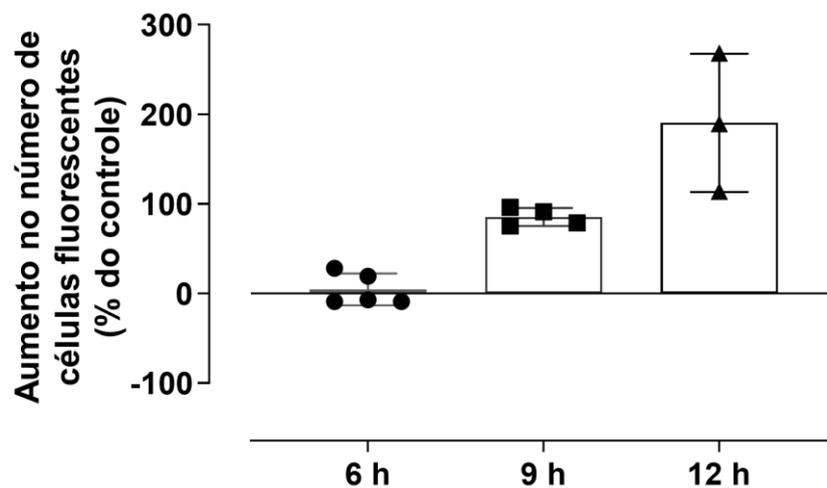
ZINSZNER, H. et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. **Genes & Development**, v. 12, n. 7, p. 982–995, 1 abr. 1998.

**APÊNDICE A – LACTATO PRÉ-REPERFUSÃO**

O sangue foi coletado da cânula da artéria femoral imediatamente antes da fase de reperfusão (90 minutos após o início da hemorragia). Os animais sham (○) foram anestesiados e canulados, mas não foram submetidos à hemorragia. Cada ponto representa um animal. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. O teste t de Student foi utilizado. \*\*\*\*p < 0.0001.

Fonte: elaborado pelo autor

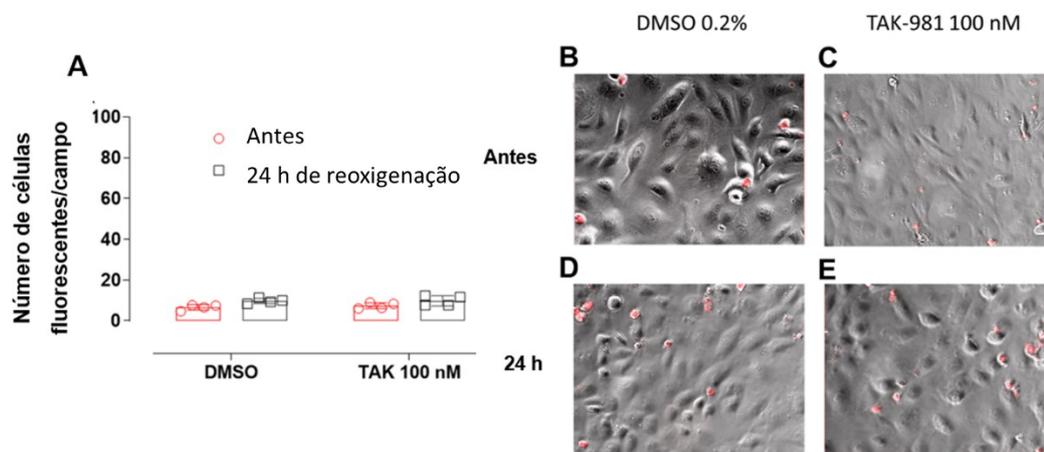
## APÊNDICE B – ESTABELECIMENTO DA DURAÇÃO DA HIPÓXIA NO ESPERIMENTO DE PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE



As células HK-2 foram incubadas com PI (6  $\mu\text{g/mL}$ ) e submetidas a diferentes tempos de hipóxia (6, 9 e 12 h) seguido de um período de reoxigenação de 24 h. As imagens foram realizadas antes dos passos de lavagem e 24 h após o protocolo de OGD. Cada ponto representa a média de 3 campos de cada poço. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: Elaborado pelo autor

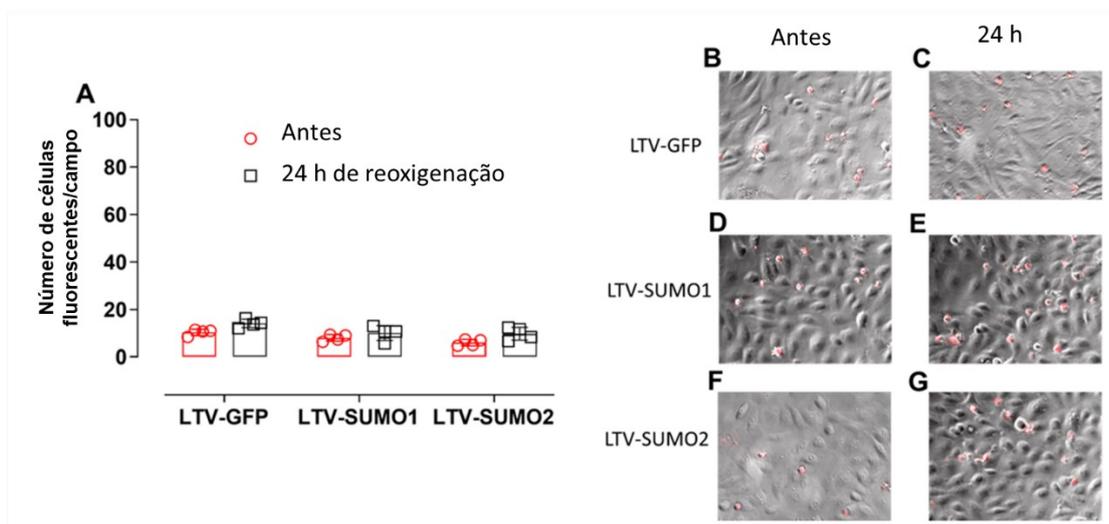
## APÊNDICE C – CÉLULAS CONTROLE – EXPERIMENTO TAK-981



As células HK-2 de controle foram submetidas aos passos de lavagem, incubação com PI (6 µg/mL, 15 min) e tratamentos (DMSO ou TAK-981), no entanto, não foram submetidas à hipóxia nem à ausência de glicose. As células foram mantidas na incubadora, a 37 °C, em uma solução salina balanceada (BSS) contendo 5,5 mg/mL de glicose. A imagem foi realizada antes dos passos de lavagem e 24 h após o protocolo de OGD. A: Número de células positivas para PI; B: Células tratadas com DMSO antes de OGD; C: Células tratadas com TAK-981 antes de OGD; D: Células tratadas com DMSO após 24 h de reoxigenação; E: Células tratadas com TAK-981 após 24 h de reoxigenação. Cada ponto representa a média de 3 campos de cada poço. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

Fonte: Elaborado pelo autor

## APÊNDICE D – CÉLULAS CONTROLE – EXPERIMENTO SUPEREXPRESSÃO SUMO1 E SUMO2



As células HK-2 de controle mutadas com lentivírus foram submetidas aos passos de lavagem e incubação com PI (6 µg/mL, 15 min), no entanto, não foram submetidas à hipóxia nem à ausência de glicose. As células foram mantidas na incubadora, a 37 °C, em uma solução salina balanceada (BSS) contendo 5,5 mg/mL de glicose. A imagem foi realizada antes dos passos de lavagem e 24 h após o protocolo de OGD. A: Número de células positivas para PI; B, D e F: antes; C, E e G: células após 24 h de substituição do meio. Cada ponto representa a média de 3 campos de cada poço. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

Fonte: Elaborado pelo autor

## ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Modulação do sistema endocanabinoide em condições críticas de saúde", protocolada sob o CEUA nº 7396250219 (ID 001235), sob a responsabilidade de **Regina de Sordi e equipe; Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 06/05/2019.

We certify that the proposal "Modulation of endocannabinoid system in critical care illness", utilizing 1648 Heterogenics rats (1648 males), protocol number CEUA 7396250219 (ID 001235), under the responsibility of **Regina de Sordi and team; Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 05/06/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2019** a **04/2022**      Área: **Farmacologia**

Origem:	<b>Biotério Central</b>	sexo:	<b>Machos</b>	idade:	<b>2 a 3 meses</b>	N:	<b>1648</b>
Espécie:	<b>Ratos heterogênicos</b>			Peso:	<b>220 a 270 g</b>		
Linhagem:	<b>Wistar</b>						

Local do experimento: Salas 112 e 113, do Departamento de Farmacologia - Bloco D - CCB.

Florianópolis, 13 de maio de 2019

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina

Adendo: o projeto inicial e que foi aprovado pela CEUA tinha título e objetivo diferentes. Com a mudança do foco do estudo, uma justificativa foi realizada junto à comissão que autorizou a manutenção do mesmo certificado, uma vez que os mesmos procedimentos experimentais iriam ser utilizados.

**ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO**

Patel, N. M., Yamada, N., **Oliveira, F. R. M. B.**, Stiehler, L., Zechendorf, E., Hinkelmann, D., Sordi, R., ... & Thiemermann, C. (2022). Inhibition of macrophage migration inhibitory factor activity attenuates haemorrhagic shock-induced multiple organ dysfunction in rats. *Frontiers in Immunology*, 13. DOI: 10.3389/fimmu.2022.886421

**Oliveira, F. R. M. B.**, Assreuy, J., & Sordi, R. (2022). The role of nitric oxide in sepsis-associated kidney injury. *Bioscience Reports*, 42(7). DOI: 10.1042/BSR20220093

**Oliveira, F. R. M. B.**, Soares, E. S., Harms, C., Cimarosti, H. I., & Sordi, R. (2022). SUMOylation in peripheral tissues under low perfusion-related pathological states. *Journal of Cellular Biochemistry*, 123(7), 1133–1147. DOI: 10.1002/jcb.30293

Patel, N. M., **Oliveira, F. R. M. B.**, Ramos, H. P., Aimaretti, E., Alves, G. F., Coldewey, S. M., Sordi, R. ... & Thiemermann, C. (2022). Inhibition of bruton's tyrosine kinase activity attenuates hemorrhagic shock-induced multiple organ dysfunction in rats. *Annals of Surgery*, 277(3), 624–633. DOI: 10.1097/SLA.000000000000535

**ANEXO C – ARTIGOS EM PREPARAÇÃO OU SUBMETIDOS**

Souza, C. F., Borges, L. B., Souza e Silva, P. C., Patricio, D. O., Rosales, T. O., Souza, N. F., **Oliveira, F. R. M. B.**, Spiller, F., Assreuy, J., Sordi, R. Cannabinoid receptor type 2 (CB2) activation reduces local and systemic inflammation induced by pneumosepsis in mice. **Submetido para *European Journal of Pharmacology*.**

**Oliveira, F. R. M. B.**, Ramos, H. P., Fernandes, D., Assreuy, J., Sordi, R. Liver injury and kidney dysfunction in hemorrhagic shock model in rats: what are the determinant factors? **Submetido para *Injury***

Sordi, R., Bojko, L., **Oliveira, F. R. M. B.**, Rosales, T. O., Souza, C. F., Moreno, L. W., Ferreira-Alves, G., Velloso, J. C. R, Fernandes, D., Gomes, J. R. Doxycycline reduces organ injury and dysfunction in a rat model of recovery hemorrhagic shock.

**Oliveira, F. R. M. B.**, Soares, E. S., Ramos, H. P., Lättig, G., Cimarosti, H. I., Harms, C., Sordi, R. Renal resilience after hemorrhagic shock is due to changes in protein SUMOylation.

**Oliveira, F. R. M. B.**, Rosales, T. O., Delgobo, M., Zanotto-Filho, A., Sordi, R., Assreuy, J. The role of nitrosylation in inflammatory parameters of pneumonia-induced sepsis.

**ANEXO D – CAPÍTULO DE LIVRO COM OBJETIVO DE  
POPULARIZAÇÃO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

**OLIVEIRA, F. R. M. B.;** SORDI, R. Causa da morte: Falência de múltiplos órgãos - Procurando alternativas para reverter este quadro. In: Laísa Villar. (Org.). Aqui se faz ciência!: pesquisas desenvolvidas em universidades federais e suas aplicabilidades para a sociedade. 1ed.Goiânia: Editora Espaço Acadêmico, 2020, v. 1, p. 1-360. ISBN: 978-65-00-06195-6

## ANEXO E – POSTAGENS PRODUZIDAS PARA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA NO INSTAGRAM® DO PPGFMC/UFSC

