

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

JOSIANE TEIXEIRA DE ANDRADE CHAVES

**PAPEL DA UBIQUITINA-LIGASE SMURF1 NA IMUNIDADE INATA E NA
RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO CONTRA A INFECÇÃO POR
*SALMONELLA TYPHIMURIUM***

Belo Horizonte

2025

JOSIANE TEIXEIRA DE ANDRADE CHAVES

**PAPEL DA UBIQUITINA-LIGASE SMURF1 NA IMUNIDADE INATA E NA
RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO CONTRA A INFECÇÃO POR
*SALMONELLA TYPHIMURIUM***

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Franco

BELO HORIZONTE

2025

043

Chaves, Josiane Teixeira de Andrade.

Papel da ubiquitina-ligase Smurf1 na imunidade inata e na resistência do hospedeiro à infecção por *Salmonella typhimurium* [manuscrito] / Josiane Teixeira de Andrade Chaves. – 2025.

71 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Franco.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Ubiquitina. 3. *Salmonella typhimurium*. 4. Imunidade Inata. 5. Macrófagos. I. Franco, Luís Henrique. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE JOSIANE TEIXEIRA DE ANDRADE CHAVES. Aos vinte e dois dias do mês de outubro de 2025 às 13:30 horas, reuniu-se de forma “on line”, utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Papel da ubiquitina ligase Smurf1 na imunidade inata e na resistência do hospedeiro à infecção por *Salmonella typhimurium*”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Luis Henrique Franco, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Priscila Carneiro Campos (University of Texas Southwestern Medical Center), aprovada; Dr. Jonilson Berlink Lima (Universidade Federal do Oeste da Bahia), aprovada; Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Luis Henrique Franco - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de outubro de 2025.

Dra. Priscila Carneiro Campos (University of Texas Southwestern Medical Center)

Dr. Jonilson Berlink Lima (UFOB)



Documento assinado digitalmente
 JONILSON BERLINK LIMA
 Data: 23/10/2025 14:02:21-0000
 Verificar em: https://validar.ufmg.br

Documento assinado digitalmente
 JONILSON BERLINK LIMA
 Data: 24/10/2025 20:00:36-0000
 Verifique em: https://validar.ufmg.br

Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)



Documento assinado digitalmente
 FLAVIO ALMEIDA AMARAL
 Data: 23/10/2025 14:02:21-0000
 Verifique em: https://validar.ufmg.br

Documento assinado digitalmente
 FABIO ANTONIO VITARELLI MARINHO
 Data: 23/10/2025 14:02:21-0000
 Verifique em: https://validar.ufmg.br

Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho (UFMG)



Documento assinado digitalmente
 FABIO ANTONIO VITARELLI MARINHO
 Data: 23/10/2025 14:02:21-0000
 Verifique em: https://validar.ufmg.br

Documento assinado digitalmente
 LUIS HENRIQUE FRANCO
 Data: 23/10/2025 14:02:21-0000
 Verifique em: https://validar.ufmg.br

Dr. Luis Henrique Franco - Orientador (UFMG)



Documento assinado digitalmente
 LUIS HENRIQUE FRANCO
 Data: 23/10/2025 14:02:21-0000
 Verifique em: https://validar.ufmg.br

Dedico este trabalho à minha família, em especial Carlos e Helena, por todo amor, apoio e inspiração ao longo desta jornada. A todos que caminharam comigo, meu sincero agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Concluir o doutorado é, antes de tudo, o resultado de uma caminhada longa, exigente e profundamente transformadora. A cada passo deste percurso, tive a sorte de contar com o apoio, a generosidade e a presença de pessoas especiais, às quais sou profundamente grata.

À minha família, à minha origem e ao meu porto seguro, agradeço por todo o amor, compreensão e incentivo incondicional. Em especial, a Carlos e Helena, que estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis e celebraram comigo cada pequena conquista. Vocês foram minha força, meu alento e minha motivação constante. A vocês, dedico este trabalho com todo o meu carinho e gratidão.

Ao meu orientador, agradeço pela confiança depositada em mim, pela orientação firme e respeitosa, e por me proporcionar um ambiente de aprendizado e desenvolvimento científico. Sua dedicação foi fundamental para que eu pudesse crescer como pesquisadora e como pessoa.

Aos membros da banca examinadora, meu agradecimento pela disponibilidade em participar desta etapa tão importante da minha formação, pelas contribuições valiosas e pelo olhar cuidadoso sobre este estudo.

Aos amigos que a vida acadêmica me trouxe, agradeço pelas conversas, pelo apoio mútuo e pelas trocas de experiências que tornaram essa jornada mais leve e significativa. Levo comigo não apenas a ciência, mas também a amizade e o companheirismo que floresceram neste caminho.

Aos professores do departamento, minha admiração e respeito pela formação sólida que me proporcionaram. Aos técnicos e funcionários, meu agradecimento pela gentileza, prontidão e profissionalismo, sempre essenciais para a realização do trabalho cotidiano.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, agradeço pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa e a manutenção do meu vínculo acadêmico.

Por fim, agradeço a Deus, por me sustentar com fé, coragem e serenidade mesmo nos momentos mais desafiadores. Sem essa presença constante, nada disso teria sido possível.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte desta trajetória: meu muito obrigada.

"Um livro, uma caneta, uma criança e um professor podem mudar o mundo."
Malala Yousafzai

RESUMO

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas, responsável pelo reconhecimento inicial do patógeno e pela ativação de mecanismos que contribuem para sua eliminação. Smurf1 é uma E3 ubiquitina ligase do hospedeiro envolvida em diferentes processos biológicos, como desenvolvimento embrionário, remodelamento tecidual e regulação da resposta imune. Já foi demonstrado que Smurf1 contribui para a resistência contra *M. tuberculosis*, favorecendo a eliminação do patógeno por autofagia, e que também atua na modulação da inflamação e do dano tecidual durante a infecção por Betacoronavírus.

Neste trabalho, investigamos a importância de Smurf1 na imunidade inata contra a infecção por *Salmonella typhimurium*. Nossos dados mostraram que a fagocitose de *Salmonella* opsonizada por proteínas do complemento foi maior em macrófagos deficientes de Smurf1. Observamos também que a deleção de Smurf1 reduziu a replicação intracelular de *S. typhimurium* em macrófagos, sem comprometer a viabilidade celular. Esse efeito foi acompanhado por menor produção de mediadores inflamatórios. Para avaliar se esse efeito estava relacionado à replicação bacteriana, utilizamos *S. typhimurium* inativada por calor e também estímulo com LPS purificado. Nessas condições, os macrófagos *Smurf1*^{-/-} apresentaram níveis mais elevados de citocinas inflamatórias do que os macrófagos WT. Nos modelos experimentais de infecção, a ausência de Smurf1 resultou em menor carga bacteriana no fígado e no baço, reduziu o dano tecidual e a inflamação, o que se refletiu em maior sobrevivência dos animais infectados. Já a inibição farmacológica com o A01 reproduziu parte desses efeitos: em macrófagos tratados observamos menor replicação bacteriana e menor secreção de citocinas, enquanto que em animais infectados o tratamento reduziu a carga bacteriana e a inflamação hepática, embora não tenha melhorado a taxa de sobrevivência. Em conjunto, nossos resultados indicam que Smurf1 atua como um regulador negativo da resposta imune inata do hospedeiro contra infecção por *S. typhimurium*. Considerando que estudos recentes apontam essa proteína como possível alvo terapêutico em diferentes doenças, futuros trabalhos poderão avaliar se a sua inibição também pode ser explorada como estratégia terapêutica no contexto da infecção bacteriana.

Palavras-chave: Smurf1, *Salmonella typhimurium*, imunidade inata, macrófagos.

ABSTRACT

Innate immunity represents the first line of defense against bacterial infections, being responsible for the initial recognition of pathogens and the activation of mechanisms that contribute to their elimination. Smurf1 is an E3 ubiquitin ligase involved in various biological processes, including embryonic development, tissue remodeling, and regulation of immune responses. It has been shown that Smurf1 contributes to resistance against *Mycobacterium tuberculosis* by promoting pathogen clearance through autophagy, and that it also modulates inflammation and tissue damage during Betacoronavirus infection.

In this study, we investigated the importance of Smurf1 in innate immunity against *Salmonella typhimurium* infection. Our data demonstrated that phagocytosis of complement-opsonized *Salmonella* was enhanced in Smurf1-deficient macrophages. We also observed that Smurf1 deletion reduced the intracellular replication of *S. typhimurium* in macrophages without affecting cell viability. This effect was accompanied by decreased production of inflammatory mediators. To determine whether this effect was specifically related to bacterial replication, we employed heat-killed *S. typhimurium* and purified LPS stimulation. Under these conditions, Smurf1^{-/-} macrophages produced higher levels of inflammatory cytokines than WT macrophages. In experimental infection models, Smurf1 deficiency resulted in lower bacterial burden in the liver and spleen, reduced tissue damage and inflammation, and ultimately improved survival of infected animals. Pharmacological inhibition with A01 recapitulated part of these effects: in treated macrophages, we observed reduced bacterial replication and cytokine secretion, while in infected animals, treatment decreased bacterial load and hepatic inflammation, although survival rates were not improved.

Collectively, our findings indicate that Smurf1 functions as a negative regulator of the innate immune response during *S. typhimurium* infection. Considering that recent studies have highlighted this protein as a potential therapeutic target in different diseases, future investigations may assess whether its inhibition could also be explored as a therapeutic strategy in the context of bacterial infections.

Keywords: Smurf1, *Salmonella typhimurium*, innate immunity, macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cascata enzimática do processo de ubiquitinação	14
Figura 2: Domínios estruturais de Smurf1 e suas principais funções	16
Figura 3: Disseminação de <i>S. typhimurium</i> após invasão intestinal	21
Figura 4: Papel de Smurf1 na associação e entrada de <i>S. typhimurium</i> em BMDMs	36
Figura 5: Replicação intracelular de <i>S. typhimurium</i> , produção de nitrito e viabilidade celular em BMDMs WT e <i>Smurf1</i> ^{-/-}	39
Figura 6: A ausência de Smurf1 alterou a produção de citocinas durante a infecção por <i>S. typhimurium</i>	42
Figura 7: Resposta à infecção por <i>S. typhimurium</i> em animais WT e <i>Smurf1</i> ^{-/-}	46
Figura 8: Efeito da inibição de Smurf1 na replicação bacteriana e na produção de citocinas inflamatórias durante a infecção por <i>S. typhimurium</i>	50
Figura 9: A inibição farmacológica de Smurf1 reduziu a carga bacteriana e protegeu o hospedeiro contra inflamação exacerbada após infecção por <i>S. typhimurium</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A01	inibidor de Smurf1
AP-1	Proteína ativadora 1
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ATP	Trifosfato de adenosina
BMDMs	Macrófagos derivados da medula óssea
BMP	Proteína morfogenética óssea
CBA	Ensaio por microesferas citométricas
CCL2	Ligante de quimiocina motivo C-C 2
CFU	Unidade formadora de colônia
CO ₂	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CXCL1	Ligante de quimiocina motivo C-X-C 1
CXCL2	Ligante de quimiocina motivo C-X-C 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERK1/2	quinases reguladas por sinal extracelular 1/2
FBS	Soro bovino fetal
GFP	proteína verde fluorescente
H&E	Hematoxilina e eosina
HECT	Homólogo ao domínio C-terminal da E6AP
IFN- γ	Interferon gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IRAK	quinase associada ao receptor de IL-1
IRF5	fator regulador de interferon 5

JNK	Quinase N-terminal de c-Jun
LCCM	Meio condicionado de células L929
LC3	Cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos 1
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MEKK2	Quinase quinase quinase 2 ativada por mitógeno
MHV-A59	Cepa A59 do vírus da hepatite murina
MOI	Multiplicidade de infecção
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	adaptador de diferenciação mielóide 88
NAG	N-acetil- β -D-glicosaminidase
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade óptica
PBS	Tampão fosfato salino
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RhoA	Membro A da família Ras homólogo
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SCV	Vacúolo contendo Salmonella
Smurf1	Fator regulador de ubiquitinação de Smad 1
SMAD1/5	Proteínas SMAD 1/5
SPI-1 e 2	ilhas de patogenicidade de <i>Salmonella</i> 1 e 2
STAT1	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
T3SS	Sistema de secreção do tipo III
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
Ub	Ubiquitina
WT	tipo selvagem (<i>wild-type</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Ubiquitinação	15
1.2. E3 ligase Smurf1	17
1.3. Smurf1 na regulação da imunidade inata contra microrganismos	19
1.4. Smurf1 como alvo terapêutico	20
1.5. Infecção por <i>Salmonella typhimurium</i> e a resposta imune inata do hospedeiro	21
2. OBJETIVO	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Animais	26
3.2. Crescimento de <i>S. typhimurium</i> e preparo do inóculo para infecção	26
3.3. Avaliação do crescimento de <i>S. typhimurium</i> na presença do inibidor de Smurf1 ..	27
3.4. Infecção de macrófagos derivados da medula óssea e quantificação da replicação bacteriana	28
3.5. Ensaio de associação e entrada bacteriana em macrófagos.....	29
3.6. Estímulo de macrófagos com LPS	30
3.7. Ensaio de viabilidade celular.....	31
3.8. Modelo de infecção <i>in vivo</i> com <i>S. typhimurium</i>	31
3.9. Análise de sobrevivência	32
3.10. Quantificação da carga bacteriana nos órgãos dos animais infectados	32
3.11. Análise histopatológica	32
3.12. Quantificação de mediadores inflamatórios.....	33
3.13. Dosagem enzimática de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) 33	

3.15. Análise estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Smurfl interferiu na fagocitose de <i>S. typhimurium</i> opsonizada por proteínas do complemento	36
4.2. A ausência de Smurfl reduziu a replicação intracelular de <i>S. typhimurium</i> em macrófagos, independentemente da produção de NO e sem afetar a viabilidade celular	39
4.3. A ausência de Smurfl alterou a produção de citocinas durante a infecção por <i>S. typhimurium</i>	42
4.4. A deficiência de Smurfl favoreceu a eliminação de <i>S. typhimurium</i> , reduziu a inflamação e o dano tecidual e melhorou a resistência do hospedeiro em um modelo experimental de salmonelose	46
4.5. A inibição farmacológica de Smurfl reduziu a replicação intracelular de <i>S. typhimurium</i> e modulou a produção de citocinas inflamatórias em macrófagos	50
4.6. A inibição farmacológica de Smurfl reduziu a eliminação de <i>Salmonella</i> e a produção de citocinas em camundongos infectados	53
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	69

1. INTRODUÇÃO

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas, atuando de forma rápida e eficaz para limitar a invasão e a disseminação desses patógenos (Clough, 2018; Turvey & Broide, 2010). Sua principal função consiste em identificar estruturas conservadas desses microrganismos, conhecidas como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Esses receptores podem estar presentes na superfície de células do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, nos endossomos, ou ainda no citoplasma, para detecção de bactérias invasoras ou componentes bacterianos durante a infecção. Esse reconhecimento imediato desencadeia a ativação de vias de sinalização que resultam na produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, além da indução de respostas efetoras antimicrobianas que atuam em conjunto para limitar a disseminação dos patógenos (Kawai & Akira, 2006; Weiss et al., 2004; Zaru, 2020). Embora não possua a especificidade da imunidade adaptativa, a resposta imune inata é indispensável para a sobrevivência, pois cria um ambiente hostil à proliferação microbiana e contribui para a ativação da resposta imune adaptativa (Iwasaki & Medzhitov, 2015; Newton & Dixit, 2012).

Entre as diversas células que compõem o sistema imune inato, os macrófagos se destacam como elementos centrais na defesa do hospedeiro contra as infecções bacterianas (Schroder et al., 2004; Wu et al., 2014). Essas células realizam fagocitose e ativam mecanismos microbicidas, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a síntese de óxido nítrico (NO) e a indução de xenofagia, fundamentais para a eliminação de patógenos (Sharma et al., 2018). Além disso, os macrófagos secretam citocinas inflamatórias que regulam a intensidade da resposta imune, garantindo o equilíbrio entre o controle da carga bacteriana e a preservação da integridade tecidual (F. C. Fang & Vázquez-Torres, 2019; Oppenheim et al., 2003; Pacher et al., 2007; Plowden et al., 2004).

As vias de sinalização intracelulares ativadas durante a resposta imune inata apresentam elevada complexidade e precisam ser finamente reguladas para assegurar um equilíbrio adequado entre a intensidade da inflamação e a ativação dos mecanismos antimicrobianos. Um descontrole nesses processos pode resultar tanto em uma resposta inflamatória exacerbada, com consequente dano tecidual, quanto em uma resposta insuficiente, favorecendo a sobrevivência e replicação do patógeno. Nesse contexto, a ubiquitinação se destaca como um processo fundamental de regulação celular, modulando de maneira dinâmica os componentes dessas vias

e garantindo a eficiência e a precisão da resposta imune (Ben-Neriah, 2002; Hu & Sun, 2016; Pickart, 2001).

1.1. Ubiquitinação

A ubiquitinação é uma modificação pós-traducional, reversível, caracterizada pela ligação covalente de uma molécula de ubiquitina (Ub) a diferentes alvos, incluindo proteínas e componentes lipídicos (Laney & Hochstrasser, 1999; Otten et al., 2021). Esse processo participa da regulação de funções celulares fundamentais para a homeostasia, como a degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassoma, modulação de vias de sinalização e o controle de respostas da imunidade inata (Grumati & Dikic, 2018; Hu & Sun, 2016).

A Ub é uma proteína altamente conservada, composta por 76 aminoácidos. Ela contém sete resíduos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63) que permitem a formação de diferentes cadeias de ubiquitinação. Essa conjugação pode ocorrer como monoubiquitinação, quando apenas uma molécula de Ub é adicionada ao substrato, ou como poliubiquitinação, quando múltiplas moléculas de Ub são ligadas em cadeia. Os diversos tipos de cadeias que podem ser formados entre a Ub e o substrato estão associados a diferentes funções celulares, sendo as cadeias de poliubiquitinação K48 e K63 as mais abundantes e mais bem caracterizadas. As cadeias K48 direcionam seus substratos para degradação via proteassoma, enquanto as cadeias K63 regulam processos, como sinalização intracelular e controle das respostas imunes (Mallette & Richard, 2012; Ohtake et al., 2016). As demais formas de ligação ainda permanecem pouco compreendidas (Akutsu et al., 2016).

O processo de ubiquitinação ocorre pela ação sequencial de três enzimas: E1 (enzima ativadora de Ub), E2 (enzima conjugadora de Ub) e E3 (enzimas Ub ligases). Inicialmente, a Ub livre no citoplasma é ativada pela enzima E1 em uma reação dependente de ATP. Em seguida, a Ub ativada é transferida de E1 para a enzima E2. Finalmente, a E2, forma um complexo com a E3 Ub ligase para promover a transferência direta ou indireta da Ub a resíduos de lisina específicos no substrato (figura 1). Nesta última etapa, a enzima E3 ligase é responsável por conferir especificidade ao processo, uma vez que reconhece e interage com os substratos-alvo a serem ubiquitinados (Pickart, 2001; Welchman et al., 2005).

Durante o desdobramento do projeto genoma humano foram identificadas aproximadamente 600 E3 ligases, que estão classificadas de acordo com suas características estruturais e mecanismos de ação (Sun & Chen, 2004). As E3 ligases estão agrupadas em três

famílias de proteínas, classificadas conforme a forma que realizam a transferência da Ub ao substrato. As E3 ligases do tipo RING (*really interesting new gene*) transferem a Ub ligada à enzima E2 diretamente para o substrato, as E3 ligases do tipo HECT (*homologous to E6AP C-terminus*) recebem a Ub de E2 e em seguida, a transfere ao substrato. Já as E3 ligases da família RBR (*RING-between-RING*) combinam características das duas anteriores (Chesarino et al., 2015; d’Azzo et al., 2005; Kim et al., 2013; Smit et al., 2014). Esses mecanismos distintos permitem que as E3 ligases participem do controle de múltiplos processos celulares, incluindo a defesa imunológica contra doenças infecciosas (Campos et al., 2022).

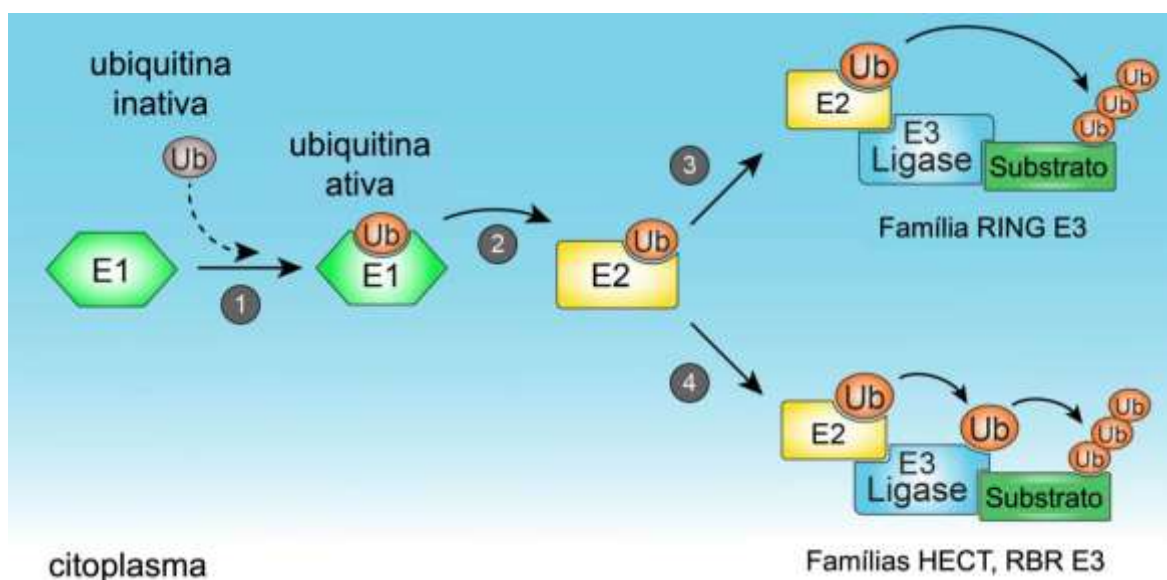


Figura 1. Cascata enzimática do processo de ubiquitinação. A Ub é ativada inicialmente pela enzima E1 em uma reação dependente de ATP (1), transferida para a enzima conjugadora E2 (2). Em seguida, E2 forma um complexo com as E3 ligases para transferência da Ub ao seu substrato. As E3 ligases da família RING transferem a Ub diretamente da E2 para o substrato (3), enquanto que E3 ligases das famílias HECT e RBR, recebem primeiro a Ub proveniente de E2, para então transferi-la ao substrato alvo (4). Adaptado de Souza-Costa et al., 2023.

1.2. E3 ligase Smurf1

Smurf1 (*Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1*) é uma E3 ligase da família HECT, inicialmente identificada no final da década de 1990 no contexto da regulação negativa da via do TGF- β (*Transforming Growth Factor beta*). Sua descoberta foi descrita por Zhu et al. (1999), que demonstraram que Smurf1 interage diretamente com as proteínas SMAD1 (*SMAD family member 1*) e SMAD5 (*SMAD family member 5*), promovendo sua ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal. Essa atividade posicionou Smurf1 como um regulador negativo da via de sinalização do TGF- β , com implicações no controle da diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e homeostase tecidual (Zhu et al., 1999). Trabalhos publicados na época, também demonstraram a participação de Smurf1 na regulação da homeostasia óssea através da ubiquitinação e degradação de Runx2 (Kaneki et al., 2006; Zhao et al., 2003), e seu papel em modular a motilidade e crescimento celular através da regulação da GTPase RhoA (H. R. Wang et al., 2003). Com o avanço das pesquisas, foram descobertos substratos de Smurf1 que atuam na regulação de diferentes processos biológicos importantes do organismo, incluindo formação óssea, diferenciação de osteoblastos, crescimento e migração celular, adesão e polaridade celular, desenvolvimento embrionário (Cao & Zhang, 2013), autofagia seletiva (Franco et al., 2017; Orvedahl et al., 2011), doenças cardiovasculares e cancerígenas (Kwei et al., 2011; Roh et al., 2019; Suzuki et al., 2008; Xia et al., 2021), além de esteatose hepática (Lin et al., 2022).

Estruturalmente Smurf1 contém três domínios principais: um domínio C2, responsável pela interação com substratos; dois domínios WW, importantes para interações proteína-proteína; e um domínio HECT, responsável pela atividade catalítica de transferência da Ub para substratos. Essa organização estrutural permite que Smurf1 reconheça alvos específicos e regule seus destinos celulares (Luiz Pedro Souza-Costa et al., 2023) (figura 2).

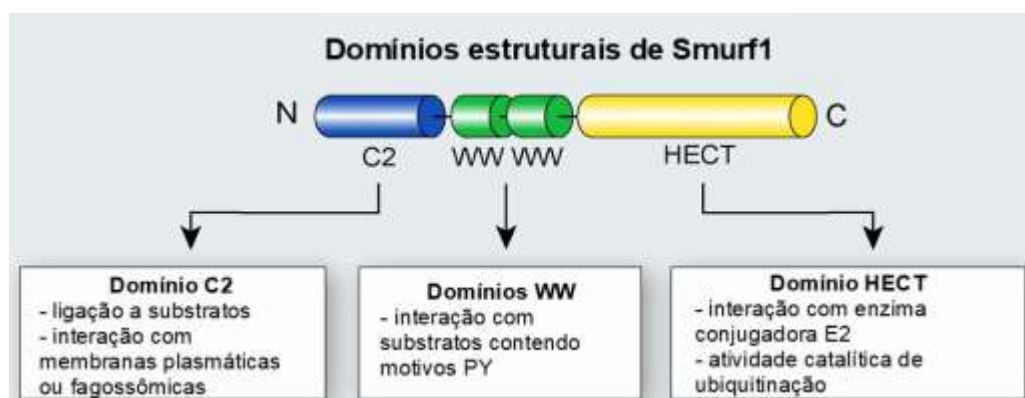


Figura 2. Domínios estruturais de Smurf1 e suas principais funções. A proteína Smurf1 apresenta três domínios principais: (1) domínio C2, localizado na região N-terminal, responsável pela ligação a substratos e interação com membranas plasmáticas ou fagossomais; (2) dois domínios WW, que interagem com substratos contendo motivos ricos em prolina (PY); e (3) o domínio HECT, situado na região C-terminal, que interage com enzimas conjugadoras E2 e exerce a atividade catalítica de ubiquitinação. Adaptado de Souza-Costa et al., 2023.

Além das funções fisiológicas citadas anteriormente, Smurf1 desempenha um papel na regulação da resposta imune por meio da degradação de proteínas-chaves de sinalização da imunidade inata. Por exemplo, Smurf1 participa da regulação negativa da via de sinalização de TLR9 através da ubiquitinação e degradação de MEKK2 (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2*), um membro da família de proteínas MAP3K (*MAP kinase kinase kinase*) que desempenha papéis importantes na transdução de sinais mediados por TLR9 (D. Zhang et al., 2006). A ubiquitinação e degradação de MEKK2 dependentes de Smurf1 levam à redução da ativação de ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2*) e à diminuição da produção de TNF (*Tumor Necrosis Factor*) e IL-6 (*Interleukin-6*) em macrófagos (Wen et al., 2015). Outro estudo demonstrou que um dos mecanismos inibitórios da sinalização de TLR4 mediado por TGF- β é dependente da ubiquitinação e degradação proteassomal de MyD88 dependente de Smurf1 (Lee et al., 2011). Smurf1 também pode regular respostas inflamatórias suprimindo a transcrição de TNF, ao interagir com USP5, uma deubiquitinase essencial para a produção dessa citocina. Em células HEK293, a interação entre Smurf1 e USP5 resultou na degradação proteassomal de USP5, e consequente redução na transcrição de TNF (Qian et al., 2016). Foi demonstrado também, que Smurf1 participa de um mecanismo de regulação de inflamação dependente de IL-1 β . Esta citocina pró-inflamatória é produzida inicialmente como

precursor inativo pró-IL-1 β , que após clivagem gera a forma biologicamente ativa (Martinon et al., 2002). Smurf1 interage com pró-IL-1 β e promove dois tipos distintos de ubiquitinação. Enquanto que o tipo K48, direciona pró-IL-1 β para degradação proteassomal, o tipo K63, favorece o processamento de pró-IL-1 β em sua forma biologicamente ativa, indicando que Smurf1 pode estimular ou inibir a secreção de IL-1 β (Yang et al., 2022). Em respostas imunes antivirais, Smurf1 interage com MAVS, uma proteína adaptadora localizada na mitocôndria, em um mecanismo dependente de Ndfip1, promovendo sua degradação e reduzindo a ativação dos fatores de transcrição que levam à produção de interferons do tipo I (Y. Wang et al., 2012). Análises bioquímicas em linhagem de macrófagos RAW264.7 tratados com IFN- γ demonstraram que Smurf1 interage fisicamente com STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*), promovendo sua degradação proteassomal (Yuan et al., 2012). Além disso, macrófagos peritoneais transfectados com shRNA específicos para Smurf1 apresentaram maior expressão dos genes *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Irf1* e *Nos2*, genes induzidos por IFN- γ , evidenciando que Smurf1 regula negativamente essa via de sinalização (Yuan et al., 2012). De maneira geral, estes trabalhos sugerem que Smurf1 interage especificamente com diversos substratos importantes para a sinalização do sistema imune, induzindo sua degradação e potencialmente regulando respostas inflamatórias.

Durante o desenvolvimento desta tese de doutorado, publicamos uma revisão da literatura detalhando todos os substratos de Smurf1 que participam da regulação da imunidade inata e como Smurf1 atua na regulação da resposta imune (Luiz Pedro Souza-Costa et al., 2023) (Anexo 1).

1.3. Smurf1 na regulação da imunidade inata contra microrganismos

Nos últimos anos, nosso grupo tem se dedicado a investigar o papel de Smurf1 na regulação da inflamação e na resistência do hospedeiro contra infecções.

Demonstramos que Smurf1 exerce papel fundamental na defesa contra a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Utilizando modelos de infecção *in vivo* e *in vitro*, mostramos que Smurf1 é essencial em promover a ubiquitinação de vacúolos contendo *M. tuberculosis* em macrófagos e direcioná-los para a via degradativa de autofagia. Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) de animais deficientes para Smurf1 (*Smurf1*^{-/-}) apresentaram defeito em ubiquitar vacúolos contendo não apenas o *M. tuberculosis*, mas também *Listeria monocytogenes*, sugerindo que o papel de Smurf1 na ubiquitinação de bactérias intracelulares

pode ser conservado entre as diferentes espécies bacterianas (Franco et al., 2017). Devido ao comprometimento na autofagia, BMDMs de animais *Smurf1*^{-/-} foram mais permissivos à replicação bacteriana. De forma consistente, em experimentos *in vivo*, animais *Smurf1*^{-/-} apresentaram maior carga de *M. tuberculosis* nos pulmões durante a fase crônica da infecção (120 dias após inoculação) e menor sobrevivência quando comparados aos animais controle WT (*Wild-type*). De maneira geral, este trabalho demonstrou que *Smurf1* funciona como um mediador da autofagia antibacteriana ao promover a ubiquitinação de vacúolos contendo bactérias.

Posteriormente, nosso grupo avaliou a importância de *Smurf1* durante a infecção por betacoronavírus. No trabalho publicado por Souza-Costa et al. (2024), foi demonstrado que, em macrófagos infectados com o vírus da hepatite murina cepa A59 (*MHV-A59*), *Smurf1* regula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e CXCL1 (*C-X-C motif chemokine ligand 1*). Em modelo murino de infecção por *MHV-A59*, a presença de *Smurf1* foi importante para atenuar o dano hepático e contribuir para a preservação da arquitetura tecidual, indicando que *Smurf1* atua como regulador da resposta inflamatória sistêmica durante a infecção por betacoronavírus (Luiz P. Souza-Costa et al., 2024).

Em conjunto, esses estudos mostram que *Smurf1* atua de forma integrada na resposta imune, participando tanto da eliminação de patógenos intracelulares, como *M. tuberculosis*, quanto da regulação da inflamação em infecções virais, como no caso dos betacoronavírus. Essa dupla função sugere que *Smurf1* contribui para equilibrar mecanismos de defesa antimicrobiana e preservação da integridade tecidual. Nesse contexto, *Smurf1* tem sido considerada uma molécula de interesse para a indústria farmacêutica, já que a modulação de sua atividade pode abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias.

1.4. Smurf1 como alvo terapêutico

Além de suas funções na imunidade e no controle da inflamação, *Smurf1* tem sido considerado como um alvo terapêutico em diferentes doenças. Essa possibilidade passou a ser explorada após a descoberta de inibidores seletivos, capazes de bloquear sua atividade e preservar da degradação proteínas regulatórias envolvidas em processos fisiológicos essenciais. Pesquisadores identificaram por meio de análises computacionais, o inibidor A01 como uma

molécula capaz de bloquear a interação entre Smurf1 e Smad1/5, aumentando a atividade da via BMP e a expressão de genes osteogênicos relacionados à formação óssea (Cao et al., 2014).

Desde então, o efeito com o tratamento com o inibidor A01 vem sendo investigado em diferentes modelos experimentais. Em doenças oculares, como catarata fibrótica e degeneração macular, o tratamento com A01 reduziu a inflamação local e impediu a progressão de processos de remodelamento tecidual, preservando a integridade estrutural e funcional da retina (F. Jiang et al., 2024; D. Li et al., 2023). Em modelos de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, o tratamento com A01 preservou a integridade da barreira endotelial, reduziu a infiltração de células inflamatórias no tecido pulmonar e atenuou o dano histológico, indicando um efeito protetor contra a inflamação exacerbada (Chen et al., 2025).

De forma complementar, um estudo recente descreveu uma nova geração de inibidores alostéricos de Smurf1. Diferentemente do A01, que atua bloqueando a interação entre Smurf1 e Smad1/5, esses compostos se ligam a regiões regulatórias do domínio HECT, promovendo alterações conformacionais que inibem a transferência de Ub para múltiplos substratos de Smurf1, e não apenas para Smad1/5. Essa estratégia se mostrou eficaz em restaurar a sinalização da via BMP e em reduzir processos inflamatórios em modelos experimentais, reforçando o potencial de Smurf1 como alvo molecular (Rothman et al., 2025).

1.5. Infecção por *Salmonella typhimurium* e a resposta imune inata do hospedeiro

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) é uma bactéria gram-negativa, flagelada e anaeróbia facultativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Trata-se de um patógeno intracelular que possui sofisticadas estratégias de evasão do sistema imune, sendo capaz de sobreviver e se replicar no interior dos macrófagos (Broz et al., 2012a; Eng et al., 2015). Devido a essas características, infecta uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo camundongos e seres humanos. Em modelos murinos, a infecção por *S. typhimurium* mimetiza a febre tifoide humana, o que torna essa bactéria amplamente utilizada como modelo experimental de estudo sobre patogênese e regulação imunológica (Akira et al., 2006; Broz et al., 2012a). *S. typhimurium* também constitui um importante problema de saúde pública, especialmente diante da crescente resistência antimicrobiana observada em cepas clínicas, reforçando a necessidade de compreender de forma mais abrangente as interações entre patógeno e hospedeiro (Billah & Rahman, 2024).

A infecção por *S. typhimurium* ocorre pela ingestão de alimentos ou água contaminados. Ao atravessar o ambiente ácido do estômago, *S. typhimurium* alcança o intestino delgado, onde interage com o epitélio intestinal. Em células epiteliais intestinais, a bactéria utiliza o sistema de secreção do tipo III-1 (T3SS-1), codificado pela *Salmonella Pathogenicity Island 1* (SPI-1), para promover a invasão. Esse sistema é composto por um complexo multiproteico, estruturalmente semelhante a seringas moleculares que atravessam a membrana bacteriana e se conectam à membrana da célula hospedeira. Por meio dessa estrutura, *S. typhimurium* injeta proteínas efetoras diretamente no citosol das células epiteliais. Esses efetores modulam diversos processos celulares, incluindo o remodelamento dinâmico do citoesqueleto de actina, que resulta na formação de extensões de membrana, facilitando a internalização bacteriana (Jepson et al., 2001). Além disso, a ação coordenada dos efetores do T3SS-1 promove alterações no epitélio intestinal, como a reorganização do citoesqueleto de actina, o que aumenta a permeabilidade da mucosa a componentes bacterianos e facilita a invasão da bactéria. Essas alterações permitem que a *S. typhimurium* alcance a lâmina própria da mucosa intestinal e estimule o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção. Ao mesmo tempo, os efetores bacterianos ativam vias de sinalização intracelulares, como NF- κ B e MAPKs, que induzem a produção de citocinas inflamatórias (TNF, IL-1 β , IL-6) e quimiocinas (CXCL1, CCL2). Dessa forma, a bactéria não apenas facilita sua própria entrada, mas também cria um ambiente inflamatório que favorece o estabelecimento da colonização inicial (Broz et al., 2012a; Geddes et al., 2007). Na lâmina própria, a infecção de macrófagos por *S. typhimurium* desencadeia múltiplas respostas imunes essenciais para o reconhecimento e eliminação do patógeno. Entre elas estão a sinalização mediada por receptores do tipo Toll (TLRs) (Akira et al., 2006; Broz et al., 2012a; Galán, 2021), a ativação de inflamassomas (Clare, 2021; Han et al., 2024) e a indução de formas de morte celular programada, como piroptose e apoptose, que contribuem para limitar a disseminação da bactéria (Brokatzky & Mostowy, 2022; Broz & Monack, 2011; Eng et al., 2015; Keestra-Gounder et al., 2015). Após atravessar o epitélio intestinal, *S. typhimurium* é fagocitada por células apresentadoras de antígeno (APCs). As células dendríticas, migram para os linfonodos mesentéricos transportando a bactéria viável, onde a infecção se estabelece (figura 3). Quando a carga bacteriana não é controlada nesse estágio, as bactérias presentes nos linfonodos extravasam para a circulação sanguínea, desencadeando um quadro de bacteremia, principalmente em indivíduos com estado de saúde comprometido. Uma vez na corrente sanguínea, *S. typhimurium* é fagocitada por macrófagos

residentes no fígado (células de Kupffer) e no baço (macrófagos da polpa vermelha e da zona marginal). Entretanto, em vez de serem eliminadas, muitas dessas bactérias conseguem sobreviver e se replicar no interior dessas células, estabelecendo nichos intracelulares. Esse processo resulta em lesões inflamatórias multifocais no fígado e no baço, caracterizadas pelo acúmulo de neutrófilos e macrófagos inflamatórios ao redor das bactérias, um achado histopatológico típico da infecção bacteriana sistêmica (Mastroeni et al., 2009).

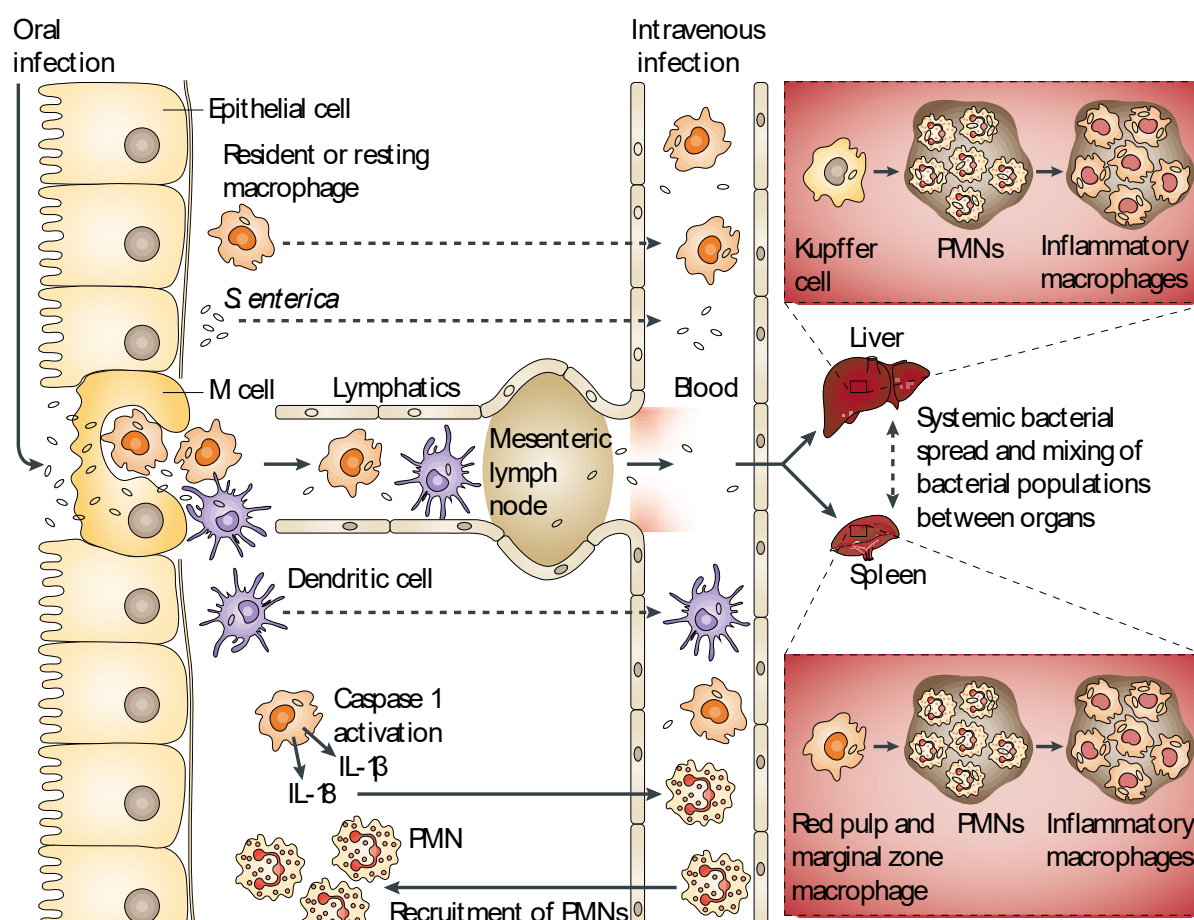


Figura 3. Disseminação de *S. typhimurium* após invasão intestinal. A bactéria transloca pelo epitélio, alcança o tecido subepitelial e se dissemina para linfonodos, sangue, fígado e baço, onde infecta populações fagocíticas e se replica em nichos intracelulares. Adaptado de Mastroeni et al. (2009).

Os macrófagos desempenham papel central no controle da infecção por *S. typhimurium* e constituem um dos principais nichos intracelulares da bactéria (Drecktrah et al., 2006; Wu et

al., 2014). Nessas células, a internalização da bactéria ocorre por fagocitose, processo em que receptores presentes na superfície dos macrófagos reconhecem a bactéria diretamente, ou após opsonização por proteínas do sistema complemento ou por anticorpos. Diferentemente das células epiteliais, onde a invasão é ativamente promovida pelo sistema T3SS-1, nos macrófagos a fagocitose constitui o principal mecanismo de entrada bacteriana na célula. O sucesso de *Salmonella* em residir e se multiplicar no interior de macrófagos depende grandemente da sua capacidade em modular a formação e a maturação do fagossomo (Akira et al., 2006; Hayashi et al., 2001; Korhonen et al., 2005; Weiss et al., 2004).

Após a fagocitose, a bactéria passa a residir em um vacúolo especializado em suportar a replicação bacteriana denominado SCV (vacúolo contendo *Salmonella*) (Broz et al., 2012b). Nesse compartimento, proteínas efetoras bacterianas são injetadas no citoplasma do macrófago para modificar o ambiente intracelular, promovendo alterações como a acidificação progressiva do vacúolo e o remodelamento da membrana vacuolar. Essas mudanças são cruciais porque a ativação do sistema de secreção do tipo III T3SS-2 depende do ambiente ácido do SCV. O T3SS-2, codificado pela ilha de patogenicidade SPI-2 (*Salmonella Pathogenicity Island-2*), é um complexo multiproteico que injeta efetores bacterianos diretamente no citoplasma da célula hospedeira. Uma vez ativado, o T3SS-2 permite a secreção de efetores especializados que reorganizam o tráfego endossômico, limitam a fusão com lisossomos e estabelecem um nicho replicativo intravacuolar. Esse processo garante que a bactéria obtenha nutrientes e sobreviva ao ataque antimicrobiano da célula hospedeira (Boumart et al., 2014; Hueffer & Galán, 2004; Keestra-Gounder et al., 2015).

Conforme destacado acima, Smurf1 tem sido associado a diversos processos de regulação imune, desde a modulação de vias de sinalização inflamatórias até mecanismos de autofagia seletiva, desempenhando papel relevante no controle da inflamação e da imunidade inata. No entanto, sua participação na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas ainda precisa ser mais bem explorado. Com base nessas informações, este trabalho tem como objetivo estudar a importância de Smurf1 em regular a imunidade inata e a resistência do hospedeiro contra a infecção por *S. typhimurium*. A hipótese deste trabalho é que Smurf1 desempenha um papel importante em regular a ativação da imunidade inata contra *Salmonella*, e que a modulação farmacológica da sua atividade pode ter efeitos cruciais na resistência contra a infecção.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Investigar o papel de Smurf1 na modulação da resposta imune inata e resistência do hospedeiro à infecção por *S. typhimurium*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o papel de Smurf1 no processo de entrada de *S. typhimurium* em macrófagos;
- Analisar o impacto da deleção genética de Smurf1 na replicação intracelular de *S. typhimurium*, na viabilidade dos macrófagos infectados e na produção de nitrito;
- Caracterizar o perfil de citocinas inflamatórias produzidas por macrófagos *Smurf1*^{-/-} em resposta à infecção por *S. typhimurium*;
- Avaliar como a deleção de Smurf1 afeta a carga bacteriana, a produção citocinas, dano tecidual e a sobrevivência de camundongos infectados com *S. typhimurium* por via oral ou intraperitoneal;
- Investigar os efeitos da inibição farmacológica de Smurf1 na resposta inflamatória e no controle bacteriano em modelos de infecção *in vitro* e *in vivo*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 (animais selvagens, WT) e camundongos geneticamente deficientes para *Smurf1* (*Smurf1*^{-/-}), ambos com fundo genético C57BL/6, conforme descrito por Yamashita et al., 2005. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob condições padronizadas de temperatura ambiente (24 ± 2 °C), com um ciclo claro/escuro de 12 horas. A alimentação foi fornecida *ad libitum*, assim como o acesso à água filtrada.

Os experimentos foram conduzidos com camundongos machos ou fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram realizados em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o protocolo nº 268/2024.

3.2. Crescimento de *S. typhimurium* e preparo do inóculo para infecção

A cepa *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028) foi utilizada em todos os experimentos. Para o preparo do inóculo, as bactérias foram inicialmente cultivadas em 10 mL de meio Luria-Bertani (LB) (KASVI, Brasil), sob agitação constante (180 rpm) a 37 °C em cultura *overnight*, afim de atingir a fase estacionária de crescimento. Nessa fase, o crescimento bacteriano desacelera devido à limitação de nutrientes e ao acúmulo de subprodutos metabólicos. As culturas obtidas nessa condição foram utilizadas em experimentos específicos, conforme indicado nas legendas das figuras. No dia seguinte, uma alíquota da cultura estacionária foi diluída na proporção de 1:50 em meio LB estéril e incubada novamente sob agitação (180 rpm) a 37 °C por 4 horas, até que as bactérias atingissem a fase logarítmica (fase log) de crescimento. Essa fase é caracterizada por alta taxa de divisão celular e elevada viabilidade bacteriana, sendo ideal para experimentos que requerem replicação ativa dos microrganismos. Além disso, nesse estágio, *Salmonella* expressa altos níveis de genes relacionados ao sistema de secreção do tipo III (T3SS-1), que contribuem para modular a resposta inflamatória inicial e iniciar a formação do vacúolo. Após o período de incubação, as culturas bacterianas (fase log ou fase estacionária) foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos. O sedimento bacteriano (pellet) foi cuidadosamente ressuspensionado em PBS 1X (tampão fosfato salino estéril, pH 7,4) e a densidade óptica da suspensão foi determinada por

espectrofotometria a 670 nm. Com base em curvas de crescimento previamente estabelecidas no laboratório, os valores de densidade óptica foram convertidos em unidades formadoras de colônia por mililitro (CFU/mL), permitindo o ajuste preciso da concentração bacteriana para os experimentos (Wu et al., 2014).

Especificamente para os experimentos que avaliaram os mecanismos de associação e entrada bacteriana em macrófagos, foram utilizadas bactérias em três condições: cultivadas na fase log, na fase estacionária ou opsonizadas com proteínas do complemento. Para a opsonização, as bactérias foram incubadas com soro humano inativado (diluído 1:1 em PBS estéril) por 30 minutos a 37 °C, sob leve agitação. Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS 1X por centrifugação (5.000 rpm por 5 minutos) para a remoção do excesso de soro e imediatamente empregadas nos ensaios de infecção.

Para os demais experimentos de replicação bacteriana, as bactérias foram cultivadas até a fase log, e as suspensões bacterianas foram diluídas para atingir a multiplicidade de infecção (MOI, *multiplicity of infection*) desejada, de acordo com os protocolos específicos de cada experimento, seja para infecção de macrófagos ou para infecção em camundongos. Nesta condição de cultivo, *S. typhimurium* apresenta elevada expressão do sistema de secreção T3SS-1, que permite a invasão ativa nas células hospedeiras por meio da injeção de efetores capazes de remodelar o citoesqueleto. Após a internalização, o ambiente intracelular caracterizado por baixo magnésio, acidificação e limitação de nutrientes desencadeia a ativação do sistema de secreção T3SS-2, cuja ação é essencial para a manutenção do SCV e para a replicação bacteriana no interior dos macrófagos.

Para os experimentos com *S. typhimurium* inativada por calor, as bactérias foram cultivadas até a fase log, as suspensões bacterianas foram ajustadas para MOI 20 e em seguida incubadas a 90° por 30 minutos, garantindo a inativação bacteriana antes da utilização nos experimentos. Nessa condição, as células são expostas apenas aos PAMPs bacterianos, de modo que a ativação ocorre predominantemente por meio do reconhecimento via PRRs presentes nos macrófagos.

3.3. Avaliação do crescimento de *S. typhimurium* na presença do inibidor de Smurf1

Nos ensaios de inibição farmacológica de Smurf1 utilizamos o inibidor A01 (Axon Medchem BV, Groningen, Holanda). Para avaliar se o composto poderia interferir no crescimento bacteriano, *S. typhimurium* foi inicialmente cultivada em meio LB a 37 °C sob

agitação, em cultura overnight, e posteriormente subcultivada até a fase log, conforme descrito acima. A suspensão bacteriana foi centrifugada, ressuspensa em LB estéril e distribuída em placas de 96 poços (200 µL/poço). O inibidor A01 foi diluído em DMSO (*dimethyl sulfoxide*, diluente de A01) de acordo com as instruções do fabricante e adicionado aos poços em concentrações finais de 10 µM ou 50 µM, em quadruplicata. Como controles, foram utilizados poços contendo bactérias tratadas apenas com DMSO ou não tratadas. As placas foram incubadas a 37 °C com agitação, e a densidade óptica registrada a 670 nm por 6 horas.

3.4. Infecção de macrófagos derivados da medula óssea e quantificação da replicação bacteriana

Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs, *bone marrow-derived macrophages*) foram obtidos a partir de camundongos WT ou *Smurf1*^{-/-}. Para isso, os animais foram eutanasiados e os fêmures e tíbias foram cuidadosamente dissecados sob condições assépticas. As extremidades ósseas foram cortadas e o conteúdo da medula foi extraído por lavagem com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, EUA) estéril, utilizando seringa com agulha calibre 25, conforme protocolo previamente descrito (Souza-Costa et al.,2024). As células da medula óssea obtidas foram semeadas em placas de Petri e cultivadas por sete dias em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco, Brasil) e 20% de meio condicionado de células L929 (LCCM, *L-cell conditioned medium*). Esse meio, derivado de fibroblastos murinos L929, é rico em M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), fator essencial para a diferenciação de macrófagos. As culturas foram mantidas a 37 °C com 5% de CO₂, e o meio foi renovado no quarto dia de cultivo. No sétimo dia, as células diferenciadas foram removidas e lavadas com PBS estéril. Em seguida, as células foram semeadas em placas de 48 poços na densidade de 3 x 10⁵ células por poço. Após 24 horas de incubação adicional para adesão e estabilização, os BMDMs foram submetidos ao protocolo de infecção. Alternativamente, para os ensaios de inibição de *Smurf1* com A01, macrófagos WT foram pré-tratados por 1 hora com o inibidor A01 (50 µM), diluído em DMSO estéril. Ensaios prévios de citotoxicidade por MTT, realizados em nosso grupo de pesquisa com ampla faixa de concentrações (0,1–100 µM) demonstraram que 50 µM foi bem tolerado pelos BMDMs ao longo de 24 horas, sem induzir morte celular significativa. Assim, esta concentração foi selecionada como dose de trabalho (dados não mostrados). Células tratadas apenas com o DMSO foram utilizadas como controle negativo do composto.

Os BMDMs foram infectados com *S.typhimurium* com uma MOI de 10. Após infecção, as placas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, as culturas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 15 minutos para permitir a fagocitose. As células foram então lavadas cuidadosamente com PBS 1X estéril para remover as bactérias não internalizadas. Em seguida, foi adicionado DMEM suplementado com 10% de FBS e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, Brasil) por 20 minutos, com o objetivo de eliminar as bactérias extracelulares. Após esse período, o meio foi substituído por DMEM contendo gentamicina a 10 µg/mL, concentração suficiente para impedir o crescimento bacteriano extracelular sem comprometer a viabilidade das células, permanecendo até o final do experimento. Nos ensaios de tratamento com A01, o meio contendo DMEM suplementado com 10% de FBS e inibidor foi adicionado aos poços pelo tempo remanescente da infecção.

Para a avaliação da replicação bacteriana intracelular, os BMDMs foram lisados nos tempos de 0, 4, 18 e 24 horas após infecção com 100 µL de solução de Triton X-100 a 1% (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS 1X por 5 minutos, para liberação das bactérias viáveis intracelulares. As amostras lisadas foram diluídas em série e plaqueadas em ágar LB para contagem de CFU após incubação de 24 horas a 37° C.

3.5. Ensaio de associação e entrada bacteriana em macrófagos

Com o objetivo de investigar o papel de Smurf1 nos mecanismos iniciais de interação entre macrófagos e bactéria, realizamos ensaios para avaliar a associação e entrada de *S. typhimurium* em BMDMs de animais WT ou *Smurf1*^{-/-}. As bactérias foram cultivadas em três condições distintas:

1. Fase log: as bactérias foram cultivadas até a fase log de crescimento. Nessa condição, a internalização ocorre por fagocitose, porém as bactérias se apresentam aos macrófagos com elevada expressão do T3SS-1 (Wu et al., 2014);
2. Fase estacionária: as bactérias foram cultivadas overnight, alcançando a fase estacionária de crescimento. Nessa condição, a entrada ocorre por fagocitose, porém há baixa expressão de T3SS-1 (Drecktrah et al., 2006);
3. Condição de fagocitose mediada por receptores do complemento: as bactérias, previamente cultivadas até a fase estacionária, foram incubadas por 30 minutos a 37 °C com soro humano inativado (14% v/v), o que chamamos de bactérias opsonizadas pelas proteínas do complemento. Nessa condição, a internalização da bactéria ocorre predominantemente por

receptores de complemento presentes na superfície dos macrófagos (Drecktrah et al., 2006; Keestra-Gounder et al., 2015).

Para este experimento, um total de 3×10^5 células foram plaqueadas em cada poço, em placas de 48 poços (Greiner Bio-One, Brasil), no volume final de 200 μ L por poço, e incubados por 24 horas a 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram infectadas com *S. typhimurium* nas condições acima descritas, de acordo com MOI indicada nas legendas das figuras. As placas foram então centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos para favorecer o contato entre bactérias e células.

Para o ensaio de associação bacteriana, as células foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 20 minutos em meio DMEM suplementado com 10% FBS. Após esse período, as células foram lisadas com solução de Triton X-100 a 0,1% em PBS, diluídas em série e plaqueadas em ágar LB para contagem de CFU após incubação de 24 horas a 37 °C. Este ensaio permitiu quantificar as bactérias associadas à superfície dos macrófagos, refletindo aquelas aderidas à membrana celular.

Em continuidade ao experimento, para o ensaio de entrada bacteriana, as células foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ com DMEM suplementado com 10% FBS contendo 50 μ g/mL de gentamicina por 20 minutos. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS 1X, lisadas com Triton X-100 a 0,1% em PBS, diluídas em série e plaqueadas em ágar LB para contagem de CFU após incubação de 24 horas a 37°C. Este ensaio permitiu quantificar especificamente as bactérias internalizadas pelos macrófagos, representando o número de bactérias localizadas no interior das células.

3.6. Estímulo de macrófagos com LPS

BMDMs de animais WT ou *Smurf1*^{-/-}, obtidos conforme descrito anteriormente, foram mantidos em cultura por 24 horas para adesão e estabilização. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS 1X e estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) de *S. typhimurium* (Sigma-Aldrich, EUA), previamente submetido à sonicação por 5 minutos para homogeneização da suspensão. As concentrações utilizadas foram 25 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL. Após 7 horas de incubação a 37 °C com 5% de CO₂ os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C para análises subsequentes.

3.7. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio brometo), que se baseia na capacidade das mitocôndrias de células metabolicamente ativas de reduzir o sal de tetrazólio MTT em cristais insolúveis de formazan. Para isso, BMDMs WT ou *Smurf1*^{-/-}, obtidos conforme descrito anteriormente, foram semeados em placas de 96 poços (Costar, USA) na densidade de 1×10^5 células por poço e mantidos em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas para aderência. Células não infectadas foram usadas como controle negativo, enquanto que células tratadas com Triton X-100 a 0,1% foram utilizadas como controle positivo. Alternativamente, células foram tratadas com o inibidor de Smurf1 A01 (50µM) ou DMSO por 24 horas. Após os períodos de incubação o meio de cultura foi cuidadosamente removido, e cada poço recebeu 100 µL de solução de MTT (Thermo Fisher Scientific, EUA) preparada na concentração final de 0,5 mg/mL em meio DMEM sem vermelho de fenol. As placas foram incubadas de 3 a 4 horas a 37 °C com 5% de CO₂, protegidas da luz. Ao término da incubação, o conteúdo dos poços foi cuidadosamente descartado, e os cristais de formazan formados no fundo de cada poço foram solubilizados com 100 µL de DMSO por poço e a absorbância foi medida a 570 nm. Os valores de absorbância foram utilizados para calcular a viabilidade celular, expressa como percentual em relação ao grupo controle não infectado.

3.8. Modelo de infecção *in vivo* com *S. typhimurium*

Camundongos WT ou *Smurf1*^{+/-} foram infectados com *S. typhimurium* por duas vias distintas: oral ou intraperitoneal. A bactéria foi cultivada até a fase log e ressuspendida em PBS estéril para preparo do inóculo.

Para o modelo de infecção oral, os animais receberam por gavagem 100 µL de PBS contendo 1×10^6 CFU de *S. typhimurium*. Para a infecção intraperitoneal, foi preparado um inóculo de 1×10^2 CFU em 100 µL de PBS estéril, sendo administrado nos animais por injeção na cavidade peritoneal com agulha de insulina.

Nos experimentos de tratamento com A01, camundongos WT receberam o A01 na dose de 10 mg/kg, diluído em 100 µL de óleo de soja (veículo) por via intraperitoneal. A primeira dose foi administrada 1 hora antes da infecção intraperitoneal. Os grupos controle receberam exclusivamente o veículo, sem o inibidor. Para assegurar a manutenção da inibição de Smurf1, doses adicionais de A01 foram administradas a cada 24 horas, de acordo com o cronograma

experimental. Os animais infectados foram eutanasiados em diferentes tempos após infecção (48 ou 72 horas), conforme a finalidade do experimento. Após a eutanásia, órgãos alvo como fígado e baço foram cuidadosamente dissecados e coletados em condições estéreis para análises subsequentes. Para os ensaios de sobrevivência, os animais receberam A01 diariamente por três dias após infecção.

3.9. Análise de sobrevivência

A análise de sobrevivência foi realizada em camundongos infectados com *S. typhimurium* tanto pela via intraperitoneal quanto pela via oral, conforme descrito anteriormente. Nos experimentos que incluíram tratamento com A01, os camundongos infectados receberam o inibidor A01 por via intraperitoneal 1 hora antes da infecção e durante três dias consecutivos. Durante o experimento, foram observados sinais de sofrimento como alterações da pelagem, postura, mobilidade, responsividade a estímulos e comportamento. Animais que apresentaram perda superior a 20% do peso corporal inicial ou sinais evidentes de sofrimento foram submetidos à eutanásia conforme diretrizes éticas. As taxas de sobrevivência foram calculadas com base nos registros diários de mortalidade dos animais. Os camundongos sobreviventes ao término do experimento foram submetidos à eutanásia programada.

3.10. Quantificação da carga bacteriana nos órgãos dos animais infectados

Para a determinação da carga bacteriana em órgãos alvo, camundongos infectados foram eutanasiados em tempos experimentais previamente definidos (48 ou 72 horas após infecção) e o fígado e o baço, foram coletados em condições assépticas e pesados individualmente em balança analítica. Cada órgão foi transferido para tubos contendo 1 mL de PBS estéril e homogeneizado mecanicamente até completa desagregação do tecido. Posteriormente os homogenatos teciduais foram diluídos em PBS 1X estéril, e plaqueados em meio LB ágar para quantificação do CFU. A carga bacteriana foi normalizada em relação ao peso do órgão analisado e expressa como número de CFU por miligrama de tecido (CFU/mg de tecido).

3.11. Análise histopatológica

Para a avaliação das alterações histopatológicas induzidas pela infecção com *S. typhimurium*, fragmentos dos órgãos alvo (fígado ou baço) foram coletados de animais WT ou *Smurf1*^{-/-} sob condições assépticas, imediatamente após a eutanásia. Os tecidos foram

imersos em solução de formalina tamponada a 10% (v/v) por 48 horas, à temperatura ambiente, para fixação. Após esse período, os fragmentos foram transferidos para solução de etanol a 70% e submetidos a processamento histológico automatizado, incluindo desidratação em gradiente alcoólico, diafanização em xilol e inclusão em parafina histológica. Os blocos parafinados foram então seccionados em micrótomo rotativo, com obtenção de cortes de 4 µm de espessura, os quais foram montados em lâminas de vidro e submetidos à coloração por hematoxilina e eosina (H&E). A avaliação histopatológica foi realizada de forma cega e independente por dois patologistas, que atribuíram escores de acordo com a intensidade da inflamação (0-3), presença de áreas de necrose (0-3), presença de êmbolos (0-3) e presença de trombos (0-1). A soma desses parâmetros resultou em um escore histopatológico total, com variação de 0 a 8 pontos para cada amostra.

3.12. Quantificação de mediadores inflamatórios

A quantificação de citocinas foi realizada tanto em sobrenadantes de cultura de BMDMs, quanto em amostras de órgãos de animais infectados. Nos experimentos *in vitro*, os macrófagos foram estimuladas com *S. typhimurium* viva ou bactérias inativadas pelo calor conforme descrito anteriormente, ou estimuladas com LPS purificado de *Salmonella* por 7 horas. A quantificação foi realizada pelo ensaio de ELISA (mouse DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As leituras de absorbância foram obtidas em leitor de microplacas a 450 nm, e os resultados expressos em valores de concentração absoluta (pg/mL).

Para a quantificação de citocinas nas amostras do fígado dos camundongos infectados, foi utilizado o ensaio Cytometric Bead Array (CBA Mouse Inflammation Kit, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA). Foram adquiridos 400 eventos por amostra em citômetro FACSVerse™ (BD Bioscience, EUA), e os dados analisados no software FCAP Array (Soft Flow, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mL, com base em curvas padrão usando regressão logística de 5 parâmetros.

3.13. Dosagem enzimática de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

A infiltração de neutrófilos e macrófagos no fígado dos animais infectados foi quantificada indiretamente por meio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e da

N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), conforme protocolo previamente padronizado (Souza et al., 2002). Brevemente, amostras de tecido (aproximadamente 100 mg) foram homogeneizadas em Buffer 1 gelado (1 mL/100 mg de tecido; composto por NaCl 0,1 M, Na₃PO₄ 0,02 M e Na₂EDTA 0,01 M, pH 4,7), e em seguida centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e, ao precipitado adicionaram-se 750 μ L de NaCl 0,2% gelado, seguido após 30 segundos por 750 μ L de NaCl 1,6% com glicose 5% gelado. As amostras foram homogeneizadas novamente e divididas em duas alíquotas iguais (750 μ L cada), destinadas às dosagens de MPO e NAG. Após nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, os precipitados foram ressuspensos em Buffer 2 (1 mL/100 mg de tecido; composto por Na₃PO₄ 0,05 M e brometo de hexadeciltrimetilamônio – HETAB – 0,5% p/v, pH 5,4), para as amostras destinadas à dosagem de MPO, ou em solução de Triton X-100 a 0,5% em salina 0,9%, para as amostras destinadas à dosagem de NAG. As amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento à temperatura ambiente, homogeneizadas e então armazenadas a –20 °C até a realização dos ensaios.

As amostras destinadas à dosagem de MPO foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado para uso imediato no ensaio enzimático. Em placas de 96 poços, foram adicionados 25 μ L de cada amostra (em duplicata), seguidos de 25 μ L de Buffer 2 (controle branco) e 25 μ L do substrato cromogênico TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 1,6 mM). Após incubação a 37 °C com 5% de CO₂ por 5 minutos, foram adicionados 100 μ L de H₂O₂ 0,002%, com nova incubação a 37 °C com 5% de CO₂ por mais 5 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 100 μ L de H₂SO₄ 1 M, e a absorbância foi lida a 450 nm utilizando leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em densidade óptica (OD).

As amostras destinadas à dosagem de NAG foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e 100 μ L do sobrenadante (diluído, se necessário) foram adicionados em duplicata a poços de placas de 96 poços contendo tampão citrato/fosfato (pH 4,5). O controle branco foi constituído pelo tampão sem amostra. Em seguida, foram adicionados 100 μ L do substrato cromogênico p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminídeo (pNP-GlcNAc, 0,767 mg/mL em tampão citrato/fosfato), e as placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 10 minutos. A reação foi interrompida com 100 μ L de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6, preparado a 4 °C), e a leitura foi realizada a 405 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (OD).

3.14. Dosagem de nitrito

A produção de nitrito nos sobrenadantes dos BMDMs foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de Griess, método amplamente utilizado como indicador indireto da síntese de NO (Giustarini et al., 2008). Para a reação, foram preparados dois reagentes: Solução A, contendo sulfanilamida a 1% (p/v) em ácido fosfórico a 2,5% (v/v) e Solução B, composta por NED a 0,1% (p/v) em ácido fosfórico a 2,5% (v/v). As soluções foram misturadas na proporção 1:1 imediatamente antes do uso, originando o reagente de Griess. Paralelamente, uma curva padrão foi construída utilizando soluções seriadas de nitrito de sódio (NaNO_2) em PBS 1X, em concentrações variando de 0 a 250 μM . O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, onde foram adicionados 50 μL de amostras ou padrões (em duplicata), seguidos de 100 μL do reagente de Griess recém preparado. As placas foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida a absorbância foi lida em espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em micromolar (μM) de nitrito.

3.15. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas vias com pós-teste de Sídák, ANOVA de uma via, teste de Mann-Whitney, teste de Kruskal-Wallis ou teste t de Student, conforme indicado nas legendas das figuras. As análises de sobrevivência foram realizadas pelo teste de Log-rank. As análises foram conduzidas no software GraphPad Prism 10.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA), sendo consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. *Smurf1* interferiu na fagocitose de *S. typhimurium* opsonizada por proteínas do complemento

Para investigarmos o papel de *Smurf1* na interação entre macrófagos e *S. typhimurium*, realizamos ensaios de associação e entrada bacteriana. Para isso, *S. typhimurium* foi cultivada em três condições distintas: fase log, fase estacionária e opsonizada por proteínas do complemento, conforme descrito anteriormente. Nosso objetivo foi avaliar se a forma como a bactéria se apresenta ao macrófago no momento inicial da infecção influencia a fagocitose, e verificar se *Smurf1* desempenha algum papel nesse processo.

Para definirmos as três condições de cultivo, realizamos uma curva de crescimento de *S. typhimurium*, que foi importante para determinar os diferentes estágios do ciclo bacteriano (1-fase lag, 2-fase log e 3-fase estacionária). Para isso, as bactérias foram cultivadas em meio LB overnight. No dia seguinte, o crescimento bacteriano foi monitorado por leituras da densidade óptica a 670 nm em intervalos de uma hora (figura 4A). Após aproximadamente 3 a 4 horas de cultivo, observamos que a bactéria atingiu a fase log, caracterizada por crescimento exponencial e elevada expressão do sistema de secreção T3SS-1 (figura 4B). Quando internalizadas pelos macrófagos nessa condição, as bactérias ativam a expressão do T3SS-2, fundamental para a formação do SCV e favorecimento da replicação intracelular. Após cerca de 5 horas, *S. typhimurium* entrou em fase estacionária, momento em que não ocorre mais crescimento exponencial, e baixa expressão de T3SS-1 (Drecktrah et al., 2006; Z. Fang & Méresse, 2022; Wu et al., 2014).

Nossos resultados demonstraram que os níveis de associação bacteriana foram semelhantes entre os macrófagos WT e *Smurf1*^{-/-} quando as células foram infectadas com *S. typhimurium* cultivada na fase log ou infectadas com as bactérias opsonizadas com proteínas do complemento. Por outro lado, quando utilizamos bactérias cultivadas até a fase estacionária, observamos níveis mais elevados de associação bacteriana em macrófagos *Smurf1*^{-/-} em comparação aos macrófagos WT, sugerindo que a ausência de *Smurf1* favoreceu a etapa inicial de interação entre a bactéria e a membrana celular (figura 4C).

No ensaio de entrada bacteriana, observamos que a internalização de *S. typhimurium* foi semelhante entre macrófagos WT e *Smurf1*^{-/-} quando as células foram infectadas com bactérias cultivadas nas fases log ou fase estacionária de crescimento. No entanto, quando as bactérias foram previamente opsonizadas com proteínas do complemento, observamos um aumento no

número de bactérias internalizadas em macrófagos *Smurf1*^{-/-} em comparação aos macrófagos WT (Figura 4D).

Em conjunto, nossos achados sugerem que *Smurf1* desempenha um papel na regulação da fagocitose via receptores do complemento.

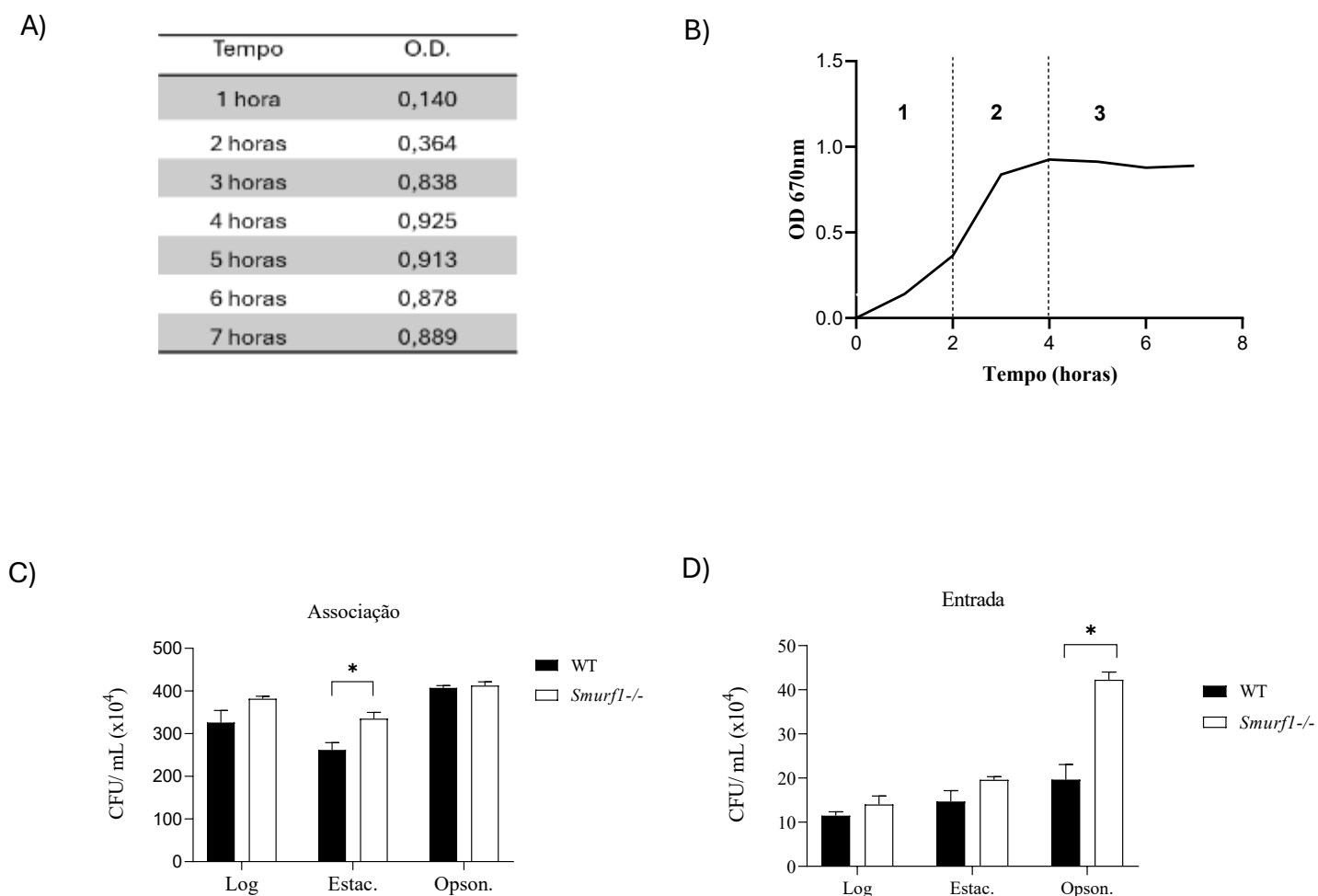


Figura 4. Dinâmica de crescimento de *S. typhimurium* e avaliação da associação e entrada bacteriana em BMDMs WT e *Smurf1*^{-/-}. (A) Leitura da densidade óptica (OD 670 nm) obtida a cada hora de cultivo bacteriano. (B) Curva de crescimento de *S. typhimurium* em meio LB, indicando as fases de desenvolvimento: 1-fase lag; 2-fase log; 3-fase estacionária. (C) Ensaio de associação de *S. typhimurium* em BMDMs WT ou *Smurf1*^{-/-} cultivadas em três condições: fase log (Log), fase estacionária (Estac.) e bactéria opsonizada por proteínas do complemento (Opson.). (D) Ensaio de entrada de *S. typhimurium* em BMDMs WT ou *Smurf1*^{-/-} cultivadas em três condições : fase log (Log), fase estacionária (Estac.) e bactéria opsonizada por proteínas do complemento (Opson.) As células foram infectadas com MOI 10. As barras representam a média \pm desvio padrão de triplicatas de amostras. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; teste two-way ANOVA.

4.2. A ausência de Smurf1 reduziu a replicação intracelular de *S. typhimurium* em macrófagos, independentemente da produção de NO e sem afetar a viabilidade celular

Para investigar a contribuição da E3 ligase Smurf1 na replicação bacteriana, BMDMs de camundongos WT ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com *S. typhimurium* (MOI 10). A carga bacteriana intracelular foi determinada pelo ensaio de CFU. Paralelamente, a produção de NO foi estimada indiretamente pela dosagem de nitrito nos sobrenadantes celulares por meio do ensaio de Griess, servindo como marcador da atividade microbicida (Chakravorty & Hensel, 2003; Korhonen et al., 2005).

A análise inicial da carga bacteriana demonstrou que imediatamente após a infecção (tempo 0 horas), os BMDMs WT e *Smurf1*^{-/-} apresentavam níveis equivalentes de bactérias viáveis, indicando que a ausência de Smurf1 não comprometeu os mecanismos de entrada da bactéria nas células hospedeiras. De forma semelhante, após 4 horas de infecção, os valores de CFU permaneceram próximos entre os dois grupos. Contudo, as diferenças entre os grupos tornaram-se evidentes em 18 horas após infecção. Nesse momento, os BMDMs WT exibiram um aumento expressivo da replicação intracelular, e os BMDMs *Smurf1*^{-/-} mostraram uma carga bacteriana significativamente menor. Esse resultado sugere que Smurf1 atua como um fator importante para a replicação intracelular de *S. typhimurium*. Já em 24 horas após infecção, a diferença entre os grupos deixou de ser evidente, pois ambos apresentaram uma redução da carga bacteriana intracelular, atingindo níveis semelhantes (figura 5A). De forma geral, este resultado de replicação bacteriana sugere que Smurf1 pode tanto facilitar a replicação bacteriana quanto inibir a atividade microbicida dos macrófagos.

Considerando a possibilidade de que Smurf1 pudesse regular mecanismos microbicidas, avaliamos os níveis de nitrito nos sobrenadantes de BMDMs infectados com *S. typhimurium*. Curiosamente, nossos resultados revelaram que 4 horas após a infecção, BMDMs WT e *Smurf1*^{-/-} apresentaram concentrações semelhantes de nitrito. Porém, no período de 18 horas após infecção, ambos os grupos apresentaram um aumento significativo da produção de nitrito, sendo que os BMDMs WT apresentaram níveis maiores em comparação aos BMDMs *Smurf1*^{-/-}. Após 24 horas, os BMDMs WT mantiveram o aumento progressivo na produção de nitrito, enquanto nos BMDMs *Smurf1*^{-/-} os valores permaneceram próximos aos observados no tempo anterior (figura 5B). Esses resultados sugerem que a maior replicação bacteriana de *S. typhimurium* na presença de Smurf1 provavelmente não decorre de uma inibição, mediada por Smurf1, dos mecanismos microbicidas dependentes de NO.

Para verificar se a menor replicação bacteriana observada nos BMDMs *Smurf1*^{-/-} poderia estar associada a alterações induzidas por *S. typhimurium* na morte celular, avaliamos em paralelo a viabilidade dos macrófagos pelo ensaio de MTT. Esse método permite estimar a atividade metabólica mitocondrial das células vivas, funcionando como um indicador indireto de sua integridade e viabilidade. Os resultados mostraram que a infecção por *S. typhimurium* reduziu progressivamente a viabilidade celular em ambos os grupos, com queda significativa em 18 horas e 24 horas após infecção em relação às células não infectadas (figura 5C). A comparação entre os genótipos não revelou diferenças significativas em nenhum dos tempos avaliados, indicando que tanto BMDMs WT quanto BMDMs *Smurf1*^{-/-} apresentaram padrões semelhantes de morte celular frente à infecção, sugerindo que o mecanismo pelo qual *Smurf1* regula a replicação bacteriana não está relacionado à morte celular dos macrófagos.

Em conjunto, nossos resultados demonstraram que a ausência de *Smurf1* reduziu a replicação intracelular de *S. typhimurium* em macrófagos, sem que esse efeito fosse relacionado ao aumento da produção de óxido nítrico, uma vez que os níveis de nitrito foram inferiores nos macrófagos *Smurf1*^{-/-} em comparação aos macrófagos WT. Além disso, a menor carga bacteriana observada não resultou de redução da viabilidade celular entre os grupos.

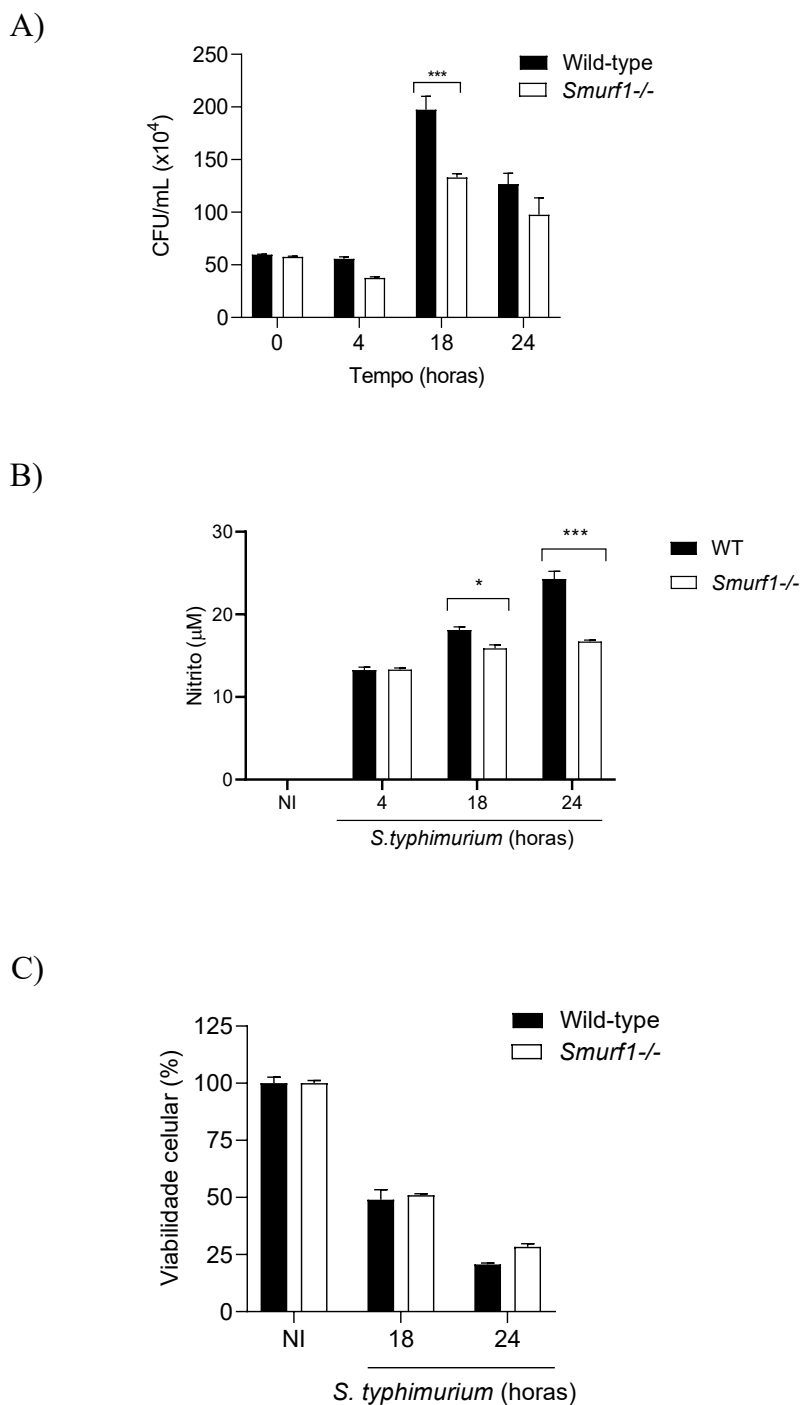


Figura 5. Replicação intracelular de *S. typhimurium*, produção de nitrito e viabilidade celular em BMDMs WT e *Smurf1*^{-/-} (A) Quantificação de CFU em BMDMs WT e *Smurf1*^{-/-} em diferentes tempos após infecção (0, 4, 18 e 24 horas). (B) Dosagem de nitrito no sobrenadante das culturas pelo método de Griess. (C) Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células não infectadas (NI) e após 18 e 24 horas de infecção. As barras representam a média \pm desvio padrão de triplicatas de amostras. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; teste two-way ANOVA.

4.3. A ausência de *Smurf1* alterou a produção de citocinas durante a infecção por *S. typhimurium*

Durante a infecção por *S. typhimurium*, os macrófagos secretam citocinas que desempenham papel central na resposta inflamatória, promovendo a ativação de células do sistema imune e contribuindo para o controle da infecção (Broz et al., 2012a; Coburn et al., 2007). Baseado nessas evidências, buscamos investigar se *Smurf1* poderia influenciar a produção de citocinas durante a infecção bacteriana. Para isso, BMDMs de animais WT ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com *S. typhimurium* e os níveis de citocinas produzidos foram quantificados por ELISA.

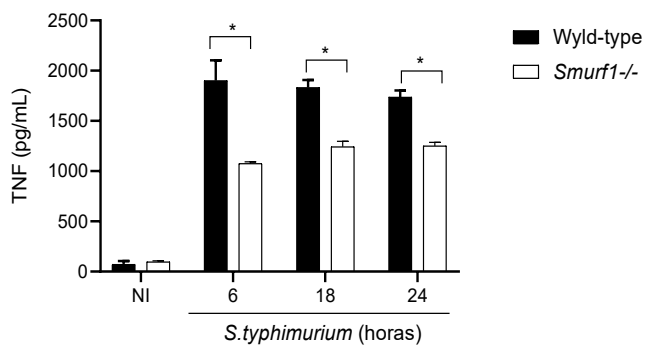
Nossos resultados demonstraram que os BMDMs *Smurf1*^{-/-} apresentaram níveis significativamente menores das citocinas inflamatórias TNF e IL-6 já nas primeiras 6 horas após a infecção, em comparação aos BMDMs WT (Figuras 6A e 6B). Essa redução se manteve nos tempos seguintes, 18 e 24 horas após infecção, incluindo também a diminuição na produção das citocinas IL-1 β , IL-12, CXCL1 e IL-10 (figuras 6C-6F). Esses dados sugerem que *Smurf1* pode estar envolvido tanto na replicação de *Salmonella* quanto na produção de citocinas.

No entanto, estudos já publicados indicam que *Smurf1* atua como regulador negativo das vias de sinalização inflamatória (Souza-Costa et al., 2023). Considerando nossos resultados, levantamos a hipótese de que a redução na produção de citocinas observada na ausência de *Smurf1* decorre da menor replicação bacteriana intracelular e, conseqüentemente, da redução da intensidade dos estímulos inflamatórios, ao invés de um efeito direto de *Smurf1* sobre as vias de sinalização inflamatórias. Para testar essa hipótese, BMDMs de animais WT ou *Smurf1*^{-/-} foram estimulados com *S. typhimurium* inativada por calor. Nesta condição, as bactérias não se replicam e o estímulo inflamatório é reduzido, ocorrendo principalmente por meio de PAMPs, como o LPS, sem a ativação prolongada que depende da replicação da bactéria viva (Jensen et al., 2016; Kalupahana et al., 2005). Curiosamente, nossos resultados demonstraram que BMDMs *Smurf1*^{-/-} expostos à bactéria inativada secretaram níveis maiores das citocinas TNF e IL-6, em contraste com a infecção com *S. typhimurium* viva (figuras 6G e 6H). De forma complementar, macrófagos foram estimulados com LPS purificado em diferentes concentrações (25, 50 e 100 ng/mL). Nossos resultados demonstraram que após 7 horas de estímulo com LPS, os BMDMs WT e BMDMs *Smurf1*^{-/-} apresentaram aumento progressivo na produção das citocinas TNF e IL-10 em relação às células não tratadas. Entretanto, na concentração de 100 ng/mL, os BMDMs *Smurf1*^{-/-} secretaram níveis mais

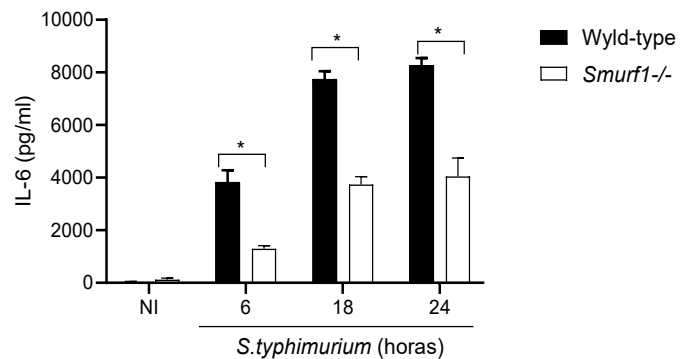
elevados de TNF em comparação aos WT. Para a citocina IL-10, as diferenças entre os grupos se tornaram evidentes a partir de 50 ng/mL e se mantiveram em 100 ng/mL, com maior produção nos BMDMs *Smurf1*^{-/-} (figuras 6I e 6J). Estes resultados indicam que, diante de estímulos inflamatórios como o LPS de bactérias inativadas, Smurf1 atua como regulador negativo da resposta inflamatória dos macrófagos, em concordância com os estudos já publicados.

Em conjunto, nossos resultados indicaram que Smurf1 desempenha um papel relevante durante a infecção por *S. typhimurium*. A ausência de Smurf1 reduziu a replicação bacteriana e, como consequência, levou à menor produção das citocinas inflamatórias. Esses achados sugerem que a presença de Smurf1 contribuiu para a criação de um ambiente mais permissivo à replicação bacteriana, sem depender da produção de nitrito ou da morte celular durante a infecção por *S. typhimurium*.

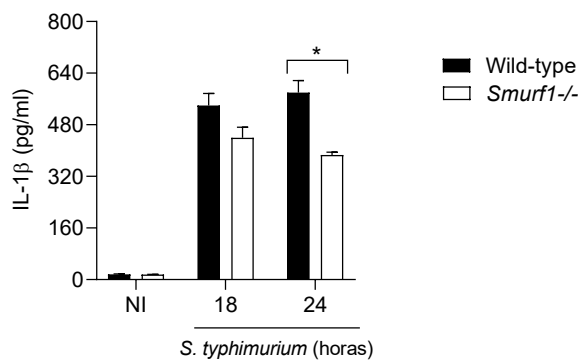
A)



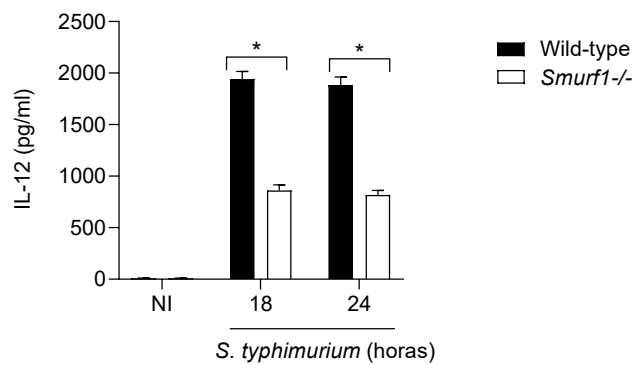
B)



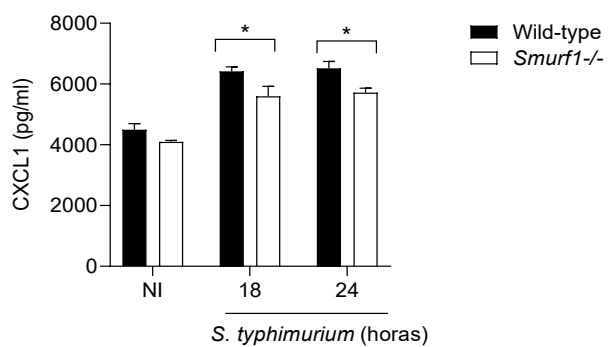
C)



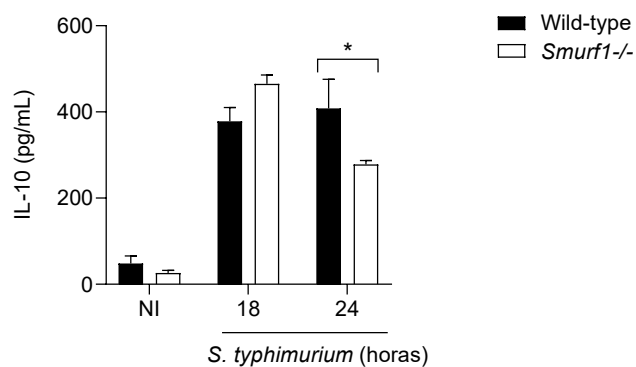
D)



E)



F)



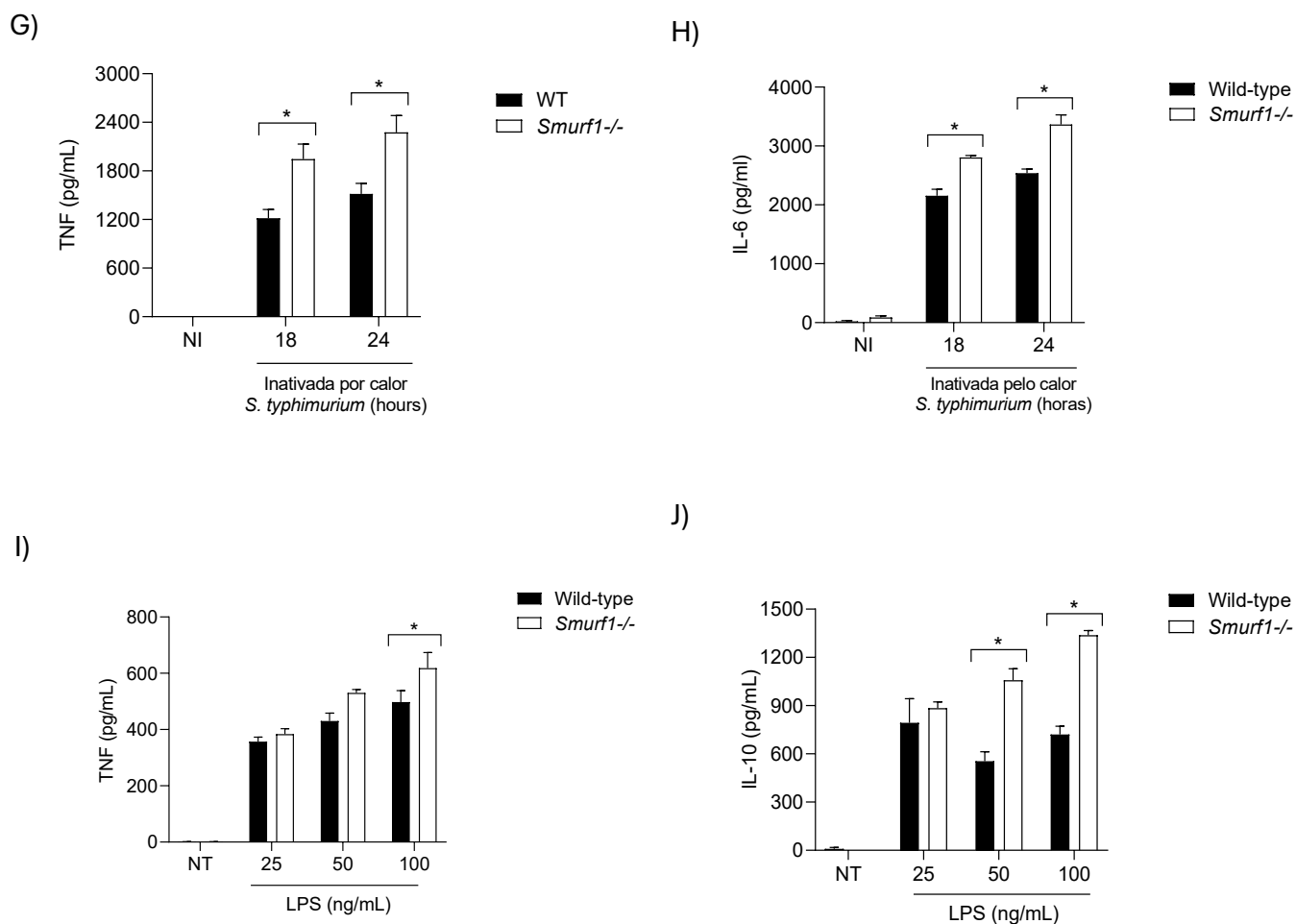


Figura 6. A ausência de Smurf1 alterou a produção de citocinas durante a infecção por *S. typhimurium*. BMDMs WT ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com *S. typhimurium* viva (MOI 10), *S. typhimurium* inativada por calor (MOI 20) ou estimulados com LPS purificado (25, 50 e 100 ng/mL). As concentrações das citocinas foram determinadas por ELISA nos tempos indicados. (A) TNF, (B) IL-6, (C) IL-1 β , (D) IL-12, (E) CXCL1 e (F) IL-10 após infecção com *S. typhimurium* viva. (G) TNF e (H) IL-6 após estímulo com *S. typhimurium* inativada por calor. (I) TNF e (J) IL-10 após estímulo com LPS. NI= não infectado. NT= não tratado. As barras representam a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Diferenças estatísticas foram avaliadas por teste two-way ANOVA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4. A deficiência de *Smurf1* favoreceu a eliminação de *S. typhimurium*, reduziu a inflamação e o dano tecidual e melhorou a resistência do hospedeiro em um modelo experimental de salmonelose

Nossos resultados *in vitro* demonstraram que *Smurf1* promoveu a replicação de *S. typhimurium* e a produção de citocinas inflamatórias após infecção. Para avaliarmos se esses resultados também se reproduziam em um modelo *in vivo* de infecção, animais WT ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados por via intraperitoneal e a carga bacteriana foi quantificada no fígado e no baço dos animais. Após 48 horas de infecção, observamos que o número de bactérias replicativas no fígado foi significativamente menor nos animais *Smurf1*^{-/-} em comparação aos animais WT. Esse padrão se manteve de forma ainda mais evidente em 72 horas após infecção, quando os animais WT apresentaram maior presença de bactérias no fígado, enquanto os animais *Smurf1*^{-/-} exibiram valores reduzidos (figura 7A). Resultado semelhante foi observado no baço, onde 72 horas após infecção os animais WT apresentaram maior carga bacteriana, enquanto os *Smurf1*^{-/-} mostraram números significativamente inferiores (figura 7B). Esses achados indicam que a ausência de *Smurf1* está associada a uma menor colonização bacteriana nos órgãos alvo avaliados após infecção.

Em seguida, quantificamos a produção de citocinas inflamatórias nos homogenatos do fígado dos animais infectados com *S. typhimurium*. Após 48 horas de infecção, não foram identificadas diferenças entre os grupos. Porém, em 72 horas após infecção, os animais WT apresentaram aumento expressivo na produção das citocinas TNF, IL-6, IFN- γ e CCL2, em relação aos animais *Smurf1*^{-/-} (figuras 7C-7F). Nos animais *Smurf1*^{-/-}, a secreção dessas citocinas se manteve menor mesmo após 72 horas de infecção, quando comparado aos níveis elevados observados nos animais WT. Em conjunto, estes resultados corroboram com os dados observamos *in vitro*, sugerindo que *Smurf1* favorece a replicação bacteriana e intensifica a inflamação.

Durante a infecção sistêmica, a literatura descreve que a replicação de *S. typhimurium* nos tecidos, associada à intensa resposta inflamatória, pode resultar em dano tecidual (Y. T. Li et al., 2016). A partir dessas evidências, realizamos uma análise histopatológica do fígado dos animais infectados. Nossos resultados demonstraram que 72 horas após infecção, os animais WT apresentaram infiltrado inflamatório multifocal distribuído no parênquima hepático, composto predominantemente por neutrófilos, além da presença de macrófagos e linfócitos, acompanhado de áreas de necrose. Ao avaliarmos o fígado dos animais *Smurf1*^{-/-} observamos

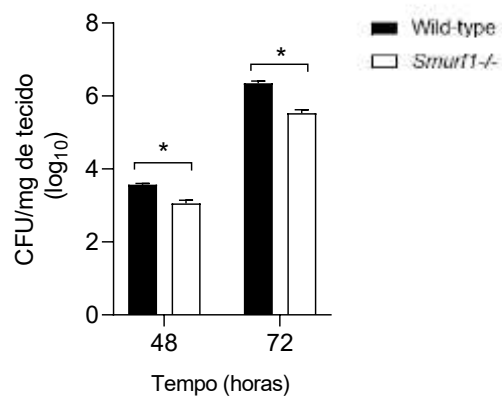
menos áreas de inflamação e necrose (figura 7G). O escore histopatológico do fígado dos animais infectados demonstrou que os animais *Smurf1*^{-/-} apresentaram maior preservação da arquitetura tecidual, enquanto os animais WT exibiram inflamação e dano tecidual significativamente maiores (figura 7H).

De forma complementar, avaliamos se o aumento do infiltrado inflamatório e dos escores histopatológicos observado no fígado dos animais estava associado ao acúmulo de macrófagos ou neutrófilo nos tecidos. Para isso, realizamos a quantificação indireta da atividade enzimática de N-acetilglucosaminidase (NAG), marcador da presença de macrófagos, e de mieloperoxidase (MPO), marcador da infiltração neutrofílica, em homogenatos hepáticos dos animais infectados. A atividade de NAG se manteve semelhante entre os grupos nos diferentes tempos analisados (figura 7I). Porém, a atividade de MPO foi significativamente maior no fígado dos animais WT em 72 horas, enquanto que os animais *Smurf1*^{-/-} apresentaram níveis reduzidos, indicando menor infiltração neutrofílica (figura 7J). Esses resultados sugerem que o aumento do dano hepático nos animais WT pode estar relacionado ao maior recrutamento de neutrófilos para o fígado.

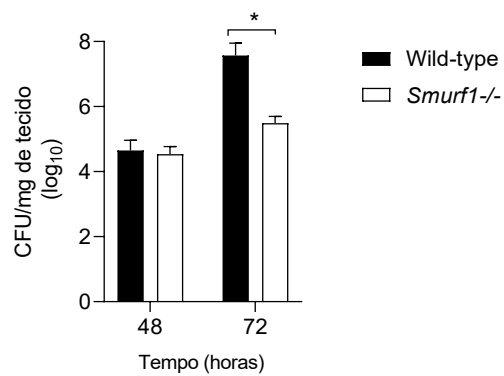
Por fim, avaliamos o impacto da ausência de *Smurf1* na resistência do hospedeiro durante a infecção por *S. typhimurium*. Para isso, animais WT ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados por via intraperitoneal ou via oral. No modelo de infecção intraperitoneal, os camundongos WT foram mais susceptíveis à infecção bacteriana, com todos os animais morrendo até o oitavo dia. Já a maioria dos camundongos *Smurf1*^{-/-} sobreviveram à infecção, apresentando taxa de sobrevivência significativamente superior aos animais WT (figura 7L). No modelo de infecção oral, observamos um resultado semelhante. Os animais WT apresentaram mortalidade acentuada ao longo de 20 dias, enquanto os animais *Smurf1*^{-/-} mantiveram uma sobrevivência prolongada e significativamente maior em relação aos animais WT (figura 7K).

Em conjunto, nossos resultados demonstraram que a ausência de *Smurf1* reduziu a replicação bacteriana no fígado e baço dos animais infectados, menor produção de citocinas pró-inflamatórias, menor infiltração celular e dano hepático, além de menor atividade de MPO associada à presença de neutrófilos. Esses dados sugerem que *Smurf1* favorece a replicação bacteriana e intensifica a inflamação durante a infecção por *S. typhimurium*, possivelmente contribuindo para o dano tecidual e comprometendo a sobrevivência do hospedeiro.

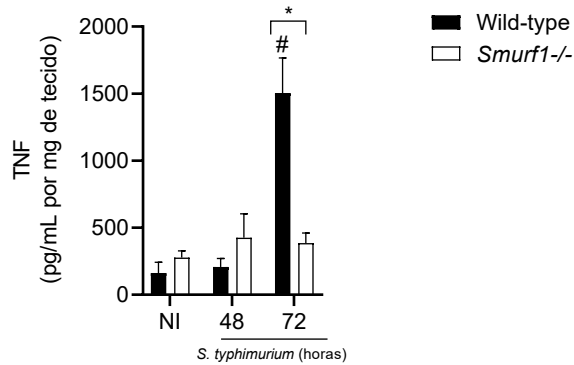
A)



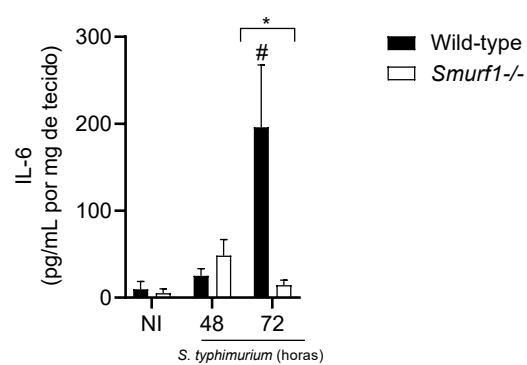
B)



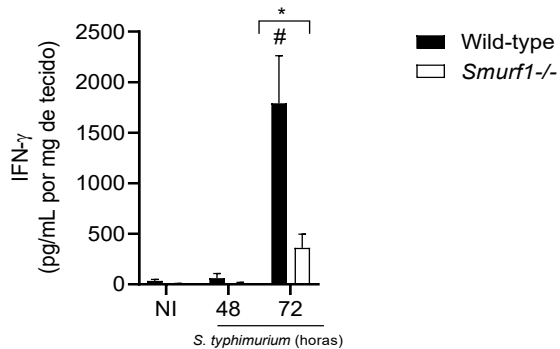
C)



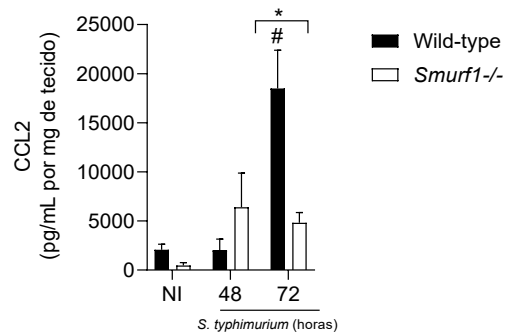
D)



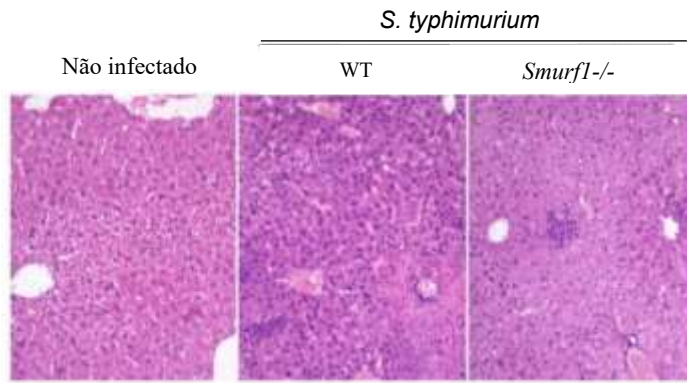
E)



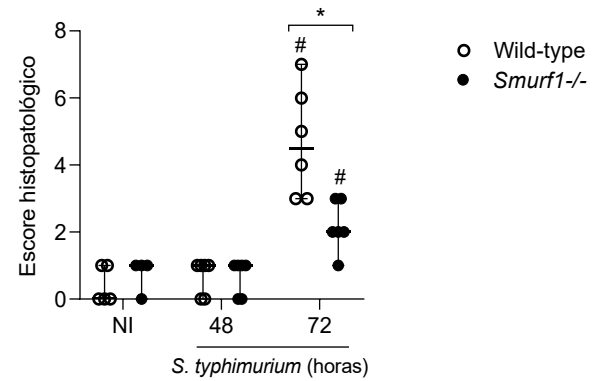
F)



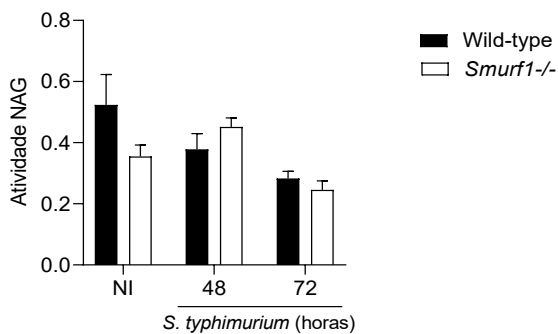
G)



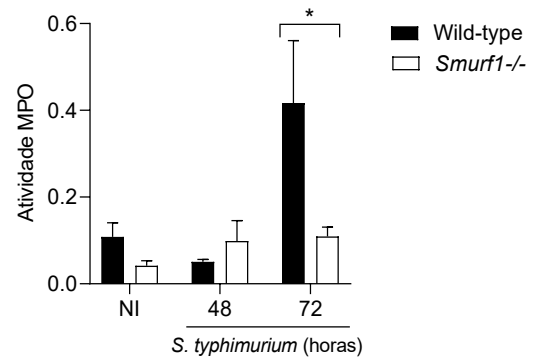
H)



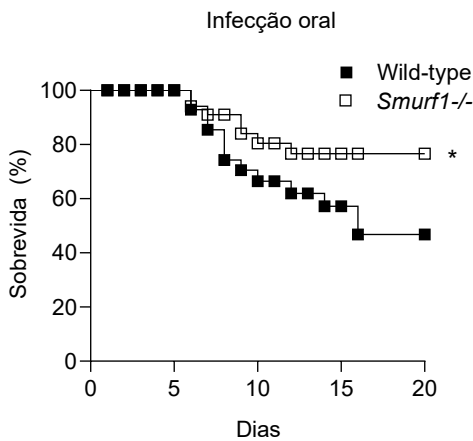
I)



J)



K)



L)

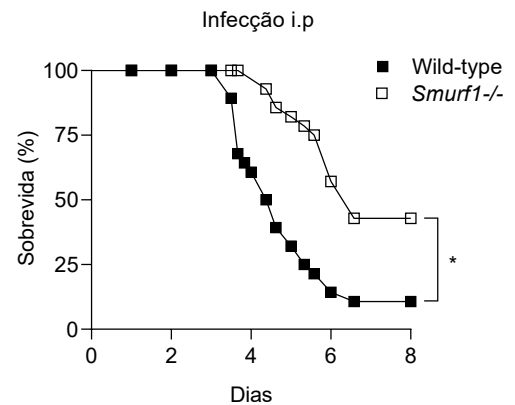


Figura 7. Resposta à infecção por *S. typhimurium* em animais WT ou *Smurf1*^{-/-}. (A-B) CFU no fígado (A) e baço (B) de animais infectados por via intraperitoneal (100 bactérias/animal), 48 e 72 horas após infecção. (C-G) Produção de citocinas em homogenatos fígado: TNF (C), IL-6 (D), IFN- γ (E), CCL2 (F), quantificadas por CBA. (G-H) Histopatologia hepática: imagens representativas em H&E (200x) (G) e escore histopatológico (H). (I-J) Atividade enzimática em homogenatos hepáticos: NAG (I) e MPO (J). (K-L) Curvas de sobrevivência após infecção oral (1×10^6 bact./animal; K) e intraperitoneal (100 bact./animal; L). NI= não infectado. As barras representam média \pm SEM. Diferenças estatísticas foram avaliadas por two-way ANOVA (A-F, I-J), Mann-Whitney test (H) e log-rank test (K-L). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 4-6$ animais por grupo (A-J); $n = 25$ animais por grupo (K-L).

4.5. A inibição farmacológica de Smurf1 reduziu a replicação intracelular de *S. typhimurium* e modulou a produção de citocinas inflamatórias em macrófagos

Trabalhos publicados anteriormente, descreveram moléculas capazes de interferir na atividade da Smurf1 (Cao et al., 2014; Rothman et al., 2025; Y. Zhang et al., 2017). Entre elas, se destaca o composto A01, uma pequena molécula identificada por meio de triagem *in silico*, que atua bloqueando o domínio WW de Smurf1. Esse bloqueio impede a ligação da enzima ao substrato SMAD1/5 e, conseqüentemente, evita sua ubiquitinação e a degradação proteossomal mediada por Smurf1 (Cao et al., 2014; Y. Zhang et al., 2017). Para confirmarmos o papel de Smurf1 na resposta imune inata durante a infecção por *S. typhimurium*, BMDMs de animais WT foram infectados com *S. typhimurium* e tratados com o composto A01. Para este experimento, as células foram tratadas por um período de 24 horas com doses crescentes de A01, de 0,1 μ M a 100 μ M. Os resultados demonstraram que a maior concentração testada e que não induziu citotoxicidade significativa nos macrófagos foi a dose de 50 μ M (dados não mostrados).

Dessa forma, BMDMs de animais WT foram tratados com A01 por 1 hora seguido da infecção. Posteriormente avaliamos a replicação bacteriana e a produção de citocinas inflamatórias. Nossos resultados demonstraram que nos tempos de 18 e 24 horas após infecção, ocorreu uma redução na carga bacteriana intracelular dos BMDMs tratados com A01 em relação aos BMDMs infectados, mas não tratados (figura 8A).

Para garantirmos que a redução de CFU observada não estivesse relacionada a um efeito direto do A01 sobre o crescimento e multiplicação de *S. typhimurium*, cultivamos a bactéria em meio LB contendo A01 ou DMSO e acompanhamos seu crescimento pela medição da densidade óptica durante um período de 6 horas. Nosso resultado demonstrou que *S. typhimurium* cresceu da mesma forma nos dois grupos, mostrando que o A01 não interferiu na replicação bacteriana (figura 8B).

Posteriormente, investigamos se a inibição de Smurf1 poderia influenciar a produção de citocinas inflamatórias. Para isso, BMDMs de animais WT foram infectados com *S. typhimurium* e tratados com A01 uma hora antes da infecção. A análise dos sobrenadantes demonstrou que BMDMs tratados com A01 secretaram níveis significativamente menores das citocinas IL-1 β e IL-12 em 18 horas e 24 horas após infecção (figuras 8C e 8D), quando comparados às células controle não tratadas.

Para confirmar que a redução da carga bacteriana e, conseqüentemente, da produção de citocinas nos BMDMs infectados e tratados com o inibidor de Smurf1 não estava associada a uma possível diminuição de viabilidade celular após tratamento com A01, realizamos um ensaio de MTT. A viabilidade celular foi avaliada após 24 horas de tratamento, e nossos resultados demonstraram que os macrófagos tratados com A01 não apresentaram alterações de viabilidade em relação às células tratadas com DMSO (figura 8E).

Em conjunto, nossos resultados demonstraram que a inibição farmacológica de Smurf1 com o composto A01 reproduziu os efeitos observados em macrófagos deficientes de Smurf1, levando à redução da carga bacteriana e da produção de citocinas inflamatórias durante a infecção por *S. typhimurium*. Além disso, tais efeitos não foram provocados por uma ação direta do A01 sobre a multiplicação bacteriana ou sobre a viabilidade em macrófagos. Esses dados sugerem que a inibição farmacológica de Smurf1 favorece a replicação de *S. typhimurium* durante a infecção.

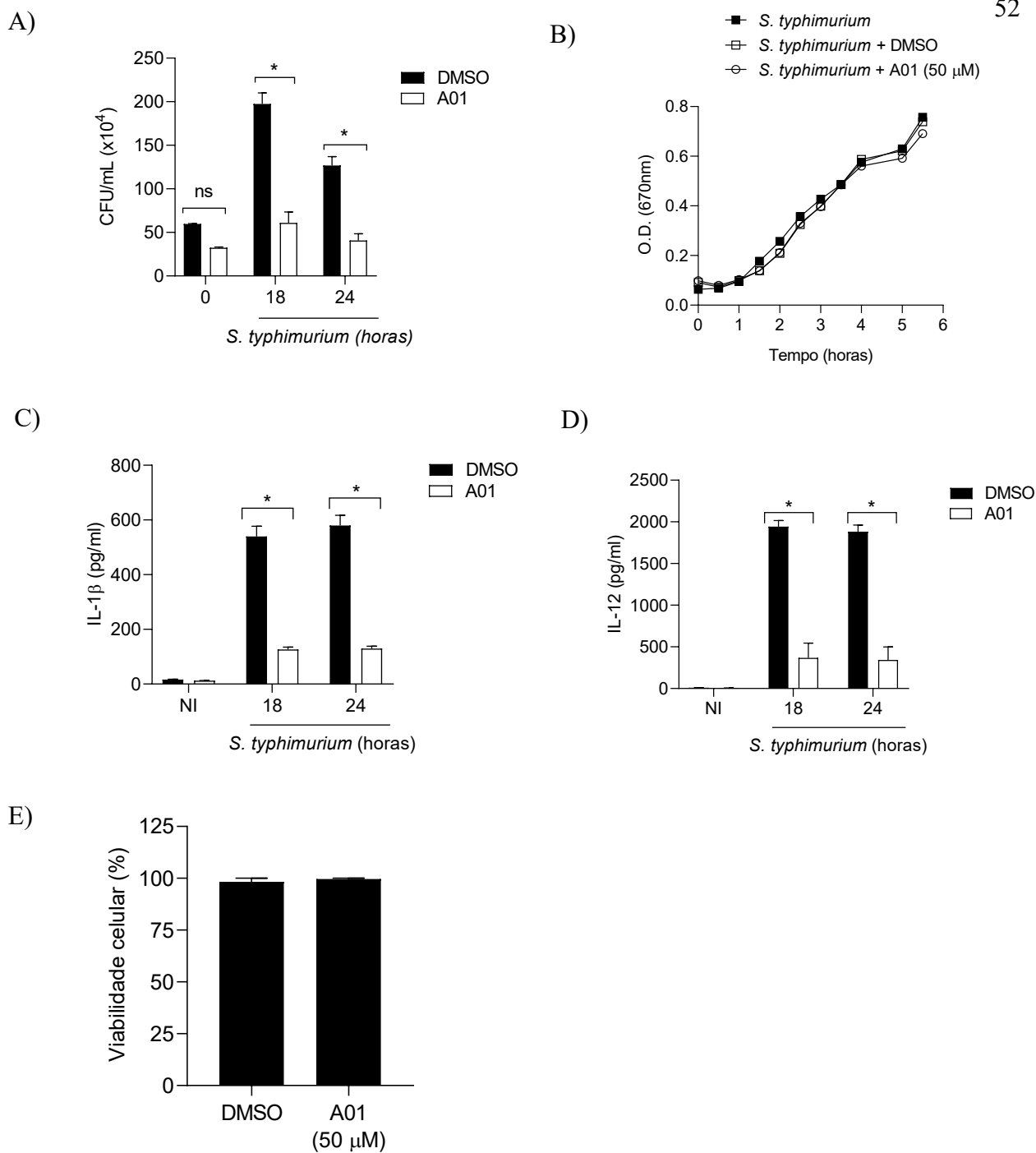


Figura 8. Efeito da inibição de Smurf1 na replicação bacteriana e na produção de citocinas inflamatórias após infecção com *S. typhimurium* (A) Quantificação de CFU em macrófagos tratados com DMSO ou tratados com A01 (50 μ M) em diferentes nos tempos 0, 18 e 24 após infecção.(B) Crescimento de *S. typhimurium* em meio LB na presença de DMSO ou A01 (50 μ M), monitorado pela densidade óptica (OD 670 nm) ao longo de 6 horas. (C-D) Produção das citocinas IL-1 β (C) e IL-12 (D) em sobrenadantes de macrófagos tratados com DMSO ou A01 (50 μ M), quantificadas por ELISA. (E) Viabilidade celular de macrófagos tratados com DMSO ou A01 (50 μ M) avaliada pelo ensaio de MTT. NI: não infectado. As barras representam a média \pm desvio padrão de experimentos independentes. * $p < 0,05$; ns: não significativo; teste two-way ANOVA.

4.6. A inibição farmacológica de Smurf1 reduziu a eliminação de *Salmonella* e a produção de citocinas em camundongos infectados

Com o objetivo de avaliar se a inibição farmacológica de Smurf1 poderia afetar a resposta imune *in vivo*, animais WT foram tratados com A01 (10 mg/kg) por via intraperitoneal uma hora antes da infecção com *S. typhimurium*, sendo mantidas doses adicionais a cada 24 horas. Após o período de 72 horas da infecção, a carga bacteriana foi quantificada no fígado e no baço dos animais. Nossos resultados demonstraram uma redução significativa no número de bactérias replicativas em ambos os órgãos em comparação aos animais tratados com o veículo (figura 9A).

Posteriormente, realizamos a quantificação de citocinas inflamatórias nos homogenatos hepáticos desses animais, e os resultados demonstraram que os níveis das citocinas TNF, IL-6 e IFN- γ estavam maiores nos animais infectados e tratados com o veículo, em comparação aos animais infectados com *S. typhimurium* e tratados com A01 (figura 9B-9D).

A análise histopatológica do fígado revelou que os animais infectados e não tratados apresentaram extensas áreas de necrose e infiltrado inflamatório intenso, enquanto o fígado dos animais infectados e tratados com o veículo ou com A01 mantiveram a arquitetura hepática preservada, com sinais mínimos de infiltração inflamatória e sem evidências de necrose intensa (figura 9E). A avaliação do escore histopatológico demonstrou que os animais infectados e tratados com o veículo exibiram uma redução do escore hepático quando comparado ao grupo infectado não tratado, embora essa diferença não tenha sido identificada estatisticamente. Porém, observamos que os animais infectados e tratados com A01 apresentaram uma redução significativa do escore histopatológico em relação aos animais infectados e não tratados (figura 9F).

Posteriormente, realizamos um ensaio de sobrevivência com animais infectados via intraperitoneal e tratados com A01, em comparação com animais infectados e tratados apenas com veículo. Os resultados demonstraram que, apesar da redução da carga bacteriana e da resposta inflamatória menos intensa nos animais tratados com A01 observada em experimentos anteriores, o tratamento não resultou em aumento significativo na taxa de sobrevivência, já que todos os animais, em ambos os grupos, acabaram não resistindo à infecção (figura 9G).

Coletivamente, os resultados dos experimentos *in vivo* demonstraram que a inibição farmacológica de Smurf1 pelo A01 reduziu de forma significativa a carga bacteriana no fígado e no baço dos animais infectados, acompanhada de menores níveis de citocinas inflamatórias e

preservação da arquitetura hepática. Embora o tratamento, não apresentou aumento na sobrevivência dos animais infectados, esses resultados indicaram que a inibição de Smurf1 foi capaz de atenuar a inflamação e contribuiu para o controle bacteriano, reproduzindo os efeitos observados nos animais deficientes de Smurf1.

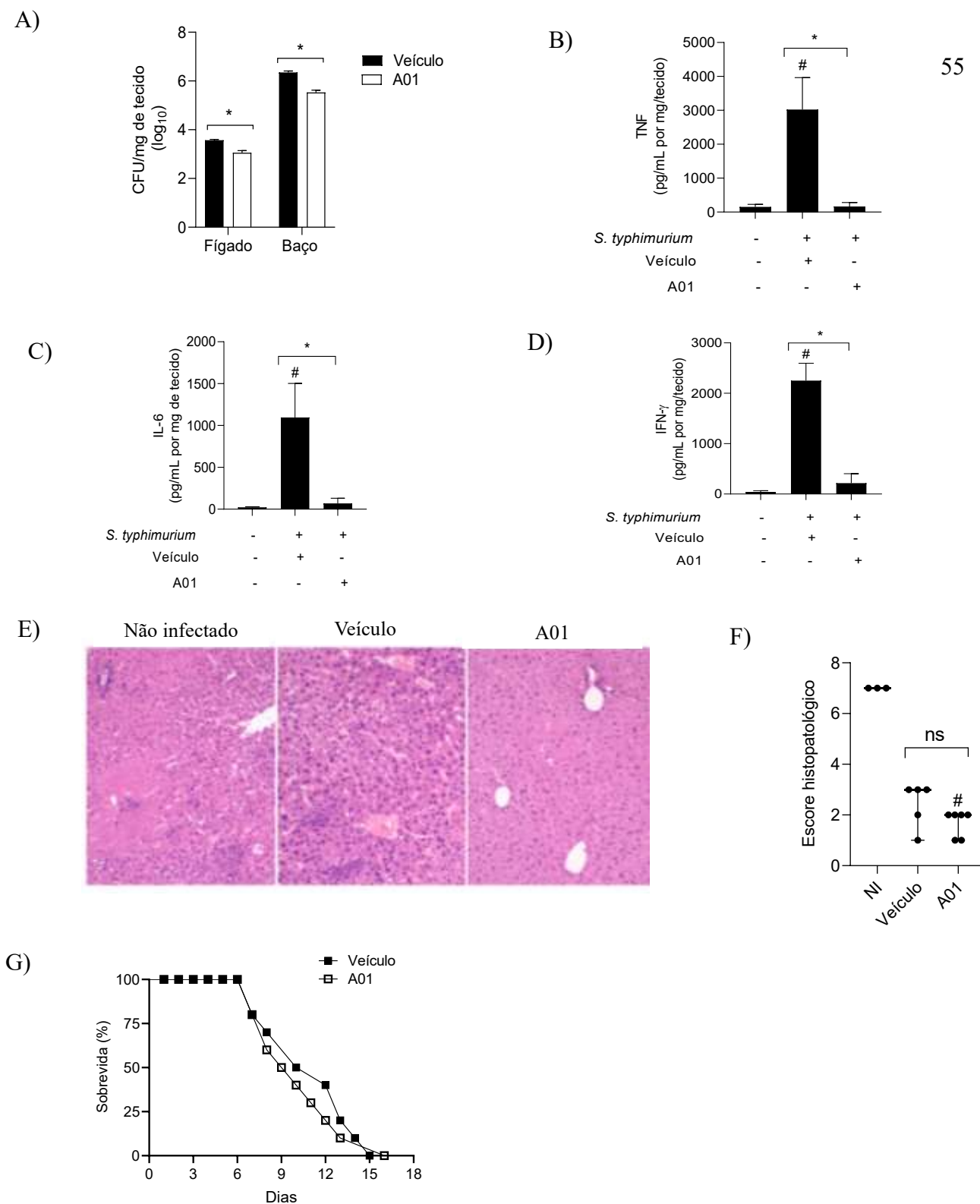


Figura 9. A inibição farmacológica de Smurf1 reduziu a carga bacteriana e protegeu o hospedeiro contra inflamação exacerbada após infecção por *S. typhimurium*. Animais WT tratados com A01 ou veículo. (A) CFU no fígado e baço após 72 horas da infecção. (B-D) níveis de TNF, IL-6 e IFN- γ nos homogeneizados hepáticos. (E) Histopatologia hepática corada com H&E (200x). (F) Escore histopatológico. (G) Curva de sobrevivência dos animais infectados. NI= não infectado. n= 4-6 camundongos por grupo (A-F) e n= 10 camundongos por grupo (G). Diferenças estatísticas foram avaliadas por teste t de Student (A), teste two-way ANOVA (B-D), Teste Kruskal-Wallis (F) e Teste Log-rank (G). Os dados representam média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: não significativo.

5. DISCUSSÃO

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa do organismo contra infecções bacterianas. Esse sistema é capaz de reconhecer rapidamente estruturas conservadas presentes nos microrganismos, conhecidas como PAMPs. Esse reconhecimento é realizado por receptores PRRs, localizados na superfície celular, em endossomos ou no citoplasma, permitindo a detecção eficiente das bactérias em diferentes compartimentos celulares. Uma vez ativados, esses receptores desencadeiam cascatas de sinalização intracelular que levam ativação da inflamação e de mecanismos microbicidas, como por exemplo, a síntese de NO. Esses processos são essenciais porque controlam a replicação bacteriana, limitam a disseminação do patógeno e garantem uma resposta rápida e eficaz do sistema imune inato. Entender como os fatores do hospedeiro atuam para modular as respostas imunes inatas é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra doenças infecciosas e inflamatórias.

Os resultados apresentados nessa tese, demonstraram que Smurf1, uma E3 Ub ligase do hospedeiro importante para o processo de ubiquitinação, regula a imunidade inata durante a infecção por *S. typhimurium*. Nossos achados indicaram que a ausência de Smurf1 favoreceu a fagocitose de bactérias opsonizadas pelas proteínas do complemento, sem interferir em outros mecanismos de entrada de *S. typhimurium* nos macrófagos, sugerindo seu envolvimento nas etapas iniciais da infecção bacteriana. Também demonstramos que Smurf1 contribuiu para maior replicação intracelular de *S. typhimurium* e maior produção de citocinas inflamatórias tanto em BMDMs quanto em animais infectados. Em concordância com esses achados, os dados obtidos em um modelo experimental de infecção por *S. typhimurium* mostraram que a presença de Smurf1 favoreceu a replicação de *S. typhimurium* no fígado e no baço dos animais, resultando em maior carga bacteriana nesses órgãos. Esse efeito esteve associado ao aumento da produção de citocinas inflamatórias, à intensificação do dano tecidual e à redução da sobrevivência dos animais. Enquanto que a inibição farmacológica de Smurf1 reduziu a replicação bacteriana e a produção de mediadores inflamatórios, preservando a integridade dos tecidos durante a infecção bacteriana. Nossos achados demonstraram que Smurf1 atua como um fator do hospedeiro que favorece a infecção por *S. typhimurium*, ao promover a replicação bacteriana e intensificar o dano tecidual inflamatório.

Nossos resultados sugerem que Smurf1 possa exercer uma função específica no controle da fagocitose mediada por receptores de complemento. Na fagocitose mediada por receptores de complemento, a ligação da bactéria opsonizada aos receptores não apenas

promove o reconhecimento, mas também ativa moléculas sinalizadoras como PI3K, Syk e membros da família das Rho GTPases (Rac1, Cdc42 e RhoA), que controlam a polimerização e remodelamento do citoesqueleto de actina e a formação de prolongamentos de membrana que envolvem a bactéria. Assim, Smurf1 poderia atuar direcionando para degradação algumas dessas proteínas reguladoras, interferindo no rearranjo do citoesqueleto e, conseqüentemente, na eficiência da fagocitose mediada por complemento. Embora as evidências da literatura sobre a participação direta de Smurf1 na fagocitose sejam limitadas, estudos prévios já demonstraram que Smurf1 interage com RhoA, uma proteína da família das GTPases que regula a reorganização do citoesqueleto de actina, promovendo o remodelamento dinâmico dos filamentos de actina que permite a formação de prolongamentos de membrana e a fagocitose (H. R. Wang et al., 2006). Esse estudo caracterizou a interação entre Smurf1 e RhoA em nível bioquímico, sem avaliar esse processo em um contexto de infecção bacteriana. Smurf1 reconheceu formas inativas de RhoA, promoveu sua ubiquitinação e direcionou essa proteína para degradação, controlando a disponibilidade de RhoA nos prolongamentos celulares. Como RhoA é um regulador central da remodelação da actina, esse mecanismo garantiu a formação de prolongamentos da membrana, a dinâmica das adesões celulares e a organização da superfície plasmática. Dessa forma, é possível supor que a ausência de Smurf1 possa levar ao acúmulo de RhoA e conseqüente alteração da organização do citoesqueleto, comprometendo a eficiência da internalização das bactérias opsonizadas pelo complemento. Esse mecanismo ajuda a explicar por que nos nossos experimentos, observamos aumento na entrada da bactéria quando opsonizada pelas proteínas do sistema do complemento em BMDMs *Smurf1*^{-/-}, mas não nas outras formas de fagocitose avaliadas (fase log ou fase estacionária). Portanto, a participação de Smurf1 na fagocitose mediada pelo sistema do complemento sugere que Smurf1 possa influenciar a interação inicial entre macrófagos e *S. typhimurium*. Esse achado abre perspectivas para investigações futuras, uma vez que a fagocitose mediada por receptores de complemento é um dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro contra bactérias opsonizadas. Ensaio de bloqueio de CR3/CR4 com anticorpos específicos em macrófagos WT ou *Smurf1*^{-/-} infectados com *S. typhimurium* poderiam confirmar se o aumento da entrada de bactérias opsonizadas observado na ausência de Smurf1 depende diretamente desses receptores de complemento. Além disso, experimentos de imunoprecipitação durante a infecção com *S. typhimurium* permitiriam avaliar se Smurf1 interage com RhoA ou outras proteínas associadas ao remodelamento da actina, permitindo

entender de que forma Smurf1 influencia a fagocitose mediada por complemento e a resposta do hospedeiro à infecção bacteriana.

O papel das E3 ligases na defesa do hospedeiro contra infecções por *Salmonella* já foi descrito anteriormente (Tripathi-Giesgen et al., 2021). A E3 ligase TRIM32 tem se destacado como um importante fator de defesa do hospedeiro durante a infecção por *Salmonella* devido à sua capacidade de reconhecer e marcar proteínas bacterianas para degradação. Um exemplo é o efector bacteriano SseK3, codificado pela ilha de patogenicidade 2 (SPI-2) de *Salmonella*, que é fundamental para a formação dos filamentos intracelulares (*Salmonella-induced filaments* – SIFs). Esses filamentos ajudam a bactéria a se replicar e a se manter dentro das células hospedeiras. TRIM32 promove a poliubiquitinação de SseK3, direcionando-o para degradação, o que bloqueia a formação das SIFs e reduz a capacidade de replicação bacteriana. Dessa forma, a TRIM32 atua como um mecanismo de defesa do hospedeiro, restringindo a ação de um efector bacteriano essencial para a virulência da *Salmonella* (Meng et al., 2023). Outro exemplo de E3 ligase descrita como um fator importante da defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares é a proteína Parkin. Durante a infecção, Parkin adiciona cadeias de Ub ao redor das bactérias que alcançam o citosol, marcando-as para eliminação pela via degradativa da autofagia. Esse processo foi demonstrado em diferentes modelos de infecção. Em estudos com *Drosophila*, a ausência de Parkin levou a uma maior suscetibilidade à infecção por *S. typhimurium*. Os experimentos demonstraram menor sobrevivência dos insetos infectados e aumento da carga bacteriana nos tecidos, evidenciando que Parkin é necessária para restringir a replicação da bactéria e contribuir para o controle da infecção. Resultados semelhantes foram observados durante a infecção com *L. monocytogenes*, mostrando que a atuação de Parkin na imunidade inata é ampla e evolutivamente preservada. Esses achados reforçam que, ao marcar patógenos para degradação, Parkin contribui diretamente para a redução da replicação bacteriana e para a manutenção do equilíbrio da resposta imune (Manzanillo et al., 2013). A E3 Ub ligase RNF213 também desempenha um papel central na defesa celular contra *S. typhimurium*. Em experimentos usando fibroblastos embrionários murinos (MEFs) infectados com *Salmonella*, RNF213 é recrutada para a superfície das bactérias que escapam do vacúolo e alcançam o citosol. Nesse local, RNF213 promove a ubiquitinação do LPS, gerando um sinal que direciona o recrutamento de outras E3 ligases, como o complexo LUBAC, e de receptores de autofagia seletiva. Na ausência de RNF213, a ubiquitinação do LPS é deficiente, os adaptadores não são recrutados de forma adequada e a

célula perde a capacidade de controlar a replicação intracelular de *S. typhimurium*, confirmando sua importância na defesa do hospedeiro contra a infecção bacteriana (Otten et al., 2021).

Entretanto, nossos resultados demonstraram que Smurf1 favoreceu a replicação bacteriana durante a infecção por *S. typhimurium*, e pode atuar de maneira diferente das E3 ligases descritas anteriormente. É possível que a forma como Smurf1 regule as respostas antimicrobianas esteja ligada ao contexto da infecção. Trabalhos publicados por nosso grupo demonstraram que durante a infecção por Betacoronavírus, Smurf1 reduz a produção de citocinas em macrófagos e protege contra o dano hepático em animais infectados com MHV-A59 (Souza-Costa et al., 2024). Além deste trabalho, foi demonstrado que Smurf1 facilita a eliminação autofágica de *M. tuberculosis* e é essencial para a resistência do hospedeiro durante a infecção (Franco et al., 2017). Nossos achados sugerem que as diferentes funções de Smurf1 em distintos modelos de infecção podem estar relacionadas à sua capacidade de ubiquitinar diferentes proteínas do hospedeiro. Dessa forma, o papel de Smurf1 na defesa do hospedeiro pode variar de acordo com os substratos envolvidos e com o tipo de infecção. Estudos futuros com técnicas bioquímicas, como ensaios de ubiquitinação *in vitro*, serão importantes para identificar quais proteínas são alvo de Smurf1 durante a infecção por *S. typhimurium* e entender melhor como Smurf1 regula a resposta imune.

Enquanto estudos anteriores indicam que Smurf1 atua como um regulador negativo da sinalização inflamatória (Souza-Costa et al., 2023), nossos resultados iniciais com infecção utilizando a bactéria viva apontaram para um efeito oposto. Para investigar se esse efeito dependia da replicação bacteriana, realizamos experimentos utilizando *S. typhimurium* inativada por calor e observamos aumento da resposta inflamatória em macrófagos deficientes de Smurf1. Isso sugere que a menor produção de mediadores inflamatórios observada nos macrófagos deficientes de Smurf1 durante a infecção com bactérias vivas pode estar relacionado à menor replicação bacteriana. De forma complementar, realizamos um experimento de estímulo de macrófagos com LPS purificado, que levou a uma resposta inflamatória mais intensa nos BMDMs *Smurf1*^{-/-} em comparação aos BMDMs WT. Dessa forma, os resultados observados na infecção com a bactéria viva não parecem refletir um efeito direto de Smurf1 na secreção das citocinas, mas sim a influência da replicação bacteriana sobre o estímulo inflamatório.

Nossos dados sugerem que Smurf1 possa atuar de forma distinta, funcionando como

um regulador negativo da resposta inflamatória induzida por PAMPs, como o LPS, enquanto que, por outro lado promove a replicação e a sobrevivência intracelular de *Salmonella* em macrófagos. Um possível mecanismo que possa explicar o menor perfil inflamatório observado nos macrófagos *Smurf1*^{-/-} seria a produção de NO pelos macrófagos do hospedeiro nos estágios iniciais da infecção. Estudos prévios já demonstraram que, embora o NO seja reconhecido amplamente como uma molécula microbicida importante no controle de infecções bacterianas, em estágios iniciais da infecção, *S. typhimurium* pode explorar esse composto produzido pelos macrófagos como um sinal do hospedeiro para ativar os genes da ilha de patogenicidade 2, SPI-2 (L. Jiang et al., 2023). Essa ativação favorece a montagem do complexo T3SS-2 e promove a replicação intracelular de *S. typhimurium*. Assim, níveis elevados de nitrito observamos em nossos experimentos com macrófagos WT podem não ter resultado em maior efeito microbicida, mas sim em maior ativação de genes de virulência, criando um ambiente mais permissivo à replicação bacteriana.

Estudos anteriores demonstraram que *S. typhimurium* desenvolveu estratégias sofisticadas para sobreviver e se multiplicar dentro das células hospedeiras (Galán, 2021; Hurley et al., 2014; Keestra-Gounder et al., 2015). Esse processo depende principalmente de dois sistemas de secreção do tipo III (T3SS), ativados em momentos distintos da infecção. O T3SS codificado pela ilha de patogenicidade 1 (SPI-1) atua nos estágios iniciais, permitindo a bactéria invadir células epiteliais através da injeção de efetores que remodelam o citoesqueleto e facilitam sua entrada. Uma vez no interior das células, a bactéria passa a expressar o T3SS-2, codificado pela ilha de patogenicidade 2 (SPI-2). Esse sistema secreta efetores capazes de alterar o SCV, bloqueando mecanismos microbicidas essenciais do hospedeiro e criando um ambiente favorável para a sobrevivência e replicação bacteriana (Haraga et al., 2008). Alguns desses efetores podem interagir e modular a atividade de E3 ligases do hospedeiro, promovendo a ubiquitinação e degradação de substratos envolvidos na sinalização inflamatória e em vias antimicrobianas (Herhaus & Dikic, 2018; Zhou & Zhu, 2015). Estas evidências nos levaram a considerar que *Smurf1* possa ser explorado pelos efetores de *Salmonella* para facilitar a replicação bacteriana em macrófagos, fenômeno já observado em outros modelos de infecção. Nossa hipótese é apoiada por estudos em *M. tuberculosis*, nos quais a proteína PPE36, um efector bacteriano, é capaz de recrutar *Smurf1* para promover a ubiquitinação do adaptador MyD88, levando à sua degradação proteossomal. Como consequência, há redução da ativação das vias NF- κ B e MAPKs, o que resulta em menor

produção de citocinas inflamatórias e maior carga bacteriana em macrófagos e em animais infectados (Peng et al., 2022). Assim, é possível considerar que *S. typhimurium* também utilize alguns de seus efetores para subverter Smurf1, criando um ambiente mais favorável à sua replicação.

Estudos recentes têm demonstrado que pequenas moléculas podem modular a atividade de Smurf1, reforçando seu potencial como alvo terapêutico. Em modelos experimentais de hipertensão arterial pulmonar, inibidores alostéricos de Smurf1 restauraram a sinalização da via BMP e reverteram alterações vasculares associadas à doença (Rothman et al., 2025). Além disso, a inibição farmacológica de Smurf1 com o composto A01 mostrou efeito protetor em um modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, reduzindo inflamação e dano tecidual (Chen et al., 2025). Estes trabalhos demonstraram que a inibição de Smurf1 pode ser explorada como estratégia terapêutica, contribuindo para o desenvolvimento de abordagens de tratamento contra doenças inflamatórias e infecciosas.

Inicialmente, avaliamos o efeito do A01 em macrófagos infectados com *S. typhimurium* e observamos que o tratamento reduziu a replicação bacteriana intracelular e diminuiu a secreção de citocinas inflamatórias. Com base nesses achados *in vitro* realizamos um modelo experimental de infecção *in vivo* para investigar se a inibição farmacológica de Smurf1 reproduziria efeitos semelhantes. Os animais tratados com A01 apresentaram uma redução da carga bacteriana no fígado e no baço após infecção, e menores níveis de citocinas inflamatórias no fígado, resultados consistentes com os resultados obtidos em nossos experimentos com animais deficientes para Smurf1. No entanto, apesar dessa diminuição da replicação bacteriana e da resposta inflamatória local, não foram observadas diferenças significativas no escore histopatológico no fígado desses animais, e nem melhora na taxa de sobrevivência entre os animais tratados com A01 e aqueles que receberam o veículo. Esses achados sugerem que a inibição farmacológica de Smurf1 contribuiu para o controle da infecção e para a redução da inflamação inicial. As diferenças entre os animais tratados com A01 e aqueles deficientes para Smurf1, se deve provavelmente, ao fato do composto A01 não bloquear totalmente a atividade de Smurf1, podendo agir sobre alvos ainda não identificados, ou falha em bloquear a atividade de Smurf1 sobre substratos específicos, que atuam exclusivamente no contexto de infecção por *Salmonella*. Isso acontece porque o A01 age de forma seletiva, bloqueando apenas a interação da Smurf1 com SMAD1/5, mas não interfere em todas as suas funções. Assim, é provável que, durante a infecção bacteriana, outros alvos de Smurf1, além de SMAD1/5,

também sejam regulados por ubiquitinação, o que não foi afetado pelo tratamento com A01. Dessa forma, estudos futuros serão importantes para identificar quais são esses substratos envolvidos na infecção por *Salmonella* e para testar inibidores mais potentes, capazes de bloquearem de forma mais ampla a atividade de Smurf1.

6. CONCLUSÃO

Os resultados desta tese demonstraram que Smurf1 exerce funções distintas durante a infecção por *S. typhimurium*. De um lado, atua como regulador negativo da resposta inflamatória provocada por PAMPs, como o LPS, ajudando a manter o equilíbrio imunológico. De outro, contribuiu para a replicação e sobrevivência intracelular de *S. typhimurium* em macrófagos. Dessa forma, este trabalho amplia o conhecimento sobre os múltiplos papéis de Smurf1 e abre caminho para estudos futuros que busquem entender seu mecanismo de ação durante a infecção por *Salmonella*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
2. Akutsu, M., Dikic, I., & Bremm, A. (2016). Ubiquitin chain diversity at a glance. *Journal of Cell Science*, *129*(5), 875–880. <https://doi.org/10.1242/jcs.183954>
3. Ben-Neriah, Y. (2002). Regulatory functions of ubiquitination in the immune system Ubiquitin-mediated protein modification. *Nature Immunology*, *3*(1), 20–26. <http://immunol.nature.com>
4. Billah, M. M., & Rahman, M. S. (2024). Salmonella in the environment: A review on ecology, antimicrobial resistance, seafood contaminations, and human health implications. *Journal of Hazardous Materials Advances*, *13*(October 2023), 100407. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2024.100407>
5. Boumart, Z., Velge, P., & Wiedemann, A. (2014). Multiple invasion mechanisms and different intracellular Behaviors: A new vision of Salmonella-host cell interaction. *FEMS Microbiology Letters*, *361*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12614>
6. Brokatzky, D., & Mostowy, S. (2022). *Pyroptosis in host defence against bacterial infection*. <https://doi.org/10.1242/dmm.049414>
7. Broz, P., & Monack, D. M. (2011). Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunological Reviews*, *243*(1), 174–190. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01041.x>
8. Broz, P., Ohlson, M. B., & Monack, D. M. (2012a). Innate immune response to Salmonella typhimurium, a model enteric pathogen. *Gut Microbes*, *3*(2), 62–70. <https://doi.org/10.4161/gmic.19141>
9. Broz, P., Ohlson, M. B., & Monack, D. M. (2012b). *typhimurium , a model enteric pathogen* © 2012 *Landes Bioscience . 0976*. <https://doi.org/10.4161/gmic.19141>
10. Campos, P. C., Cunha, D. T., Souza-Costa, L. P., Shiloh, M. U., & Franco, L. H. (2022). Bag it, tag it: ubiquitin ligases and host resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Trends in Microbiology*, *30*(10), 973–985. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.03.010>
11. Cao, Y., Wang, C., Zhang, X., Xing, G., Lu, K., Gu, Y., He, F., & Zhang, L. (2014). Selective small molecule compounds increase BMP-2 responsiveness by inhibiting Smurf1-mediated Smad1/5 degradation. *Scientific Reports*, *4*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep04965>
12. Cao, Y., & Zhang, L. (2013). A Smurf1 tale: Function and regulation of an ubiquitin ligase in multiple cellular networks. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 70, Issue 13, pp. 2305–2317). <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1170-7>
13. Chakravorty, D., & Hensel, M. (2003). Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and Infection*, *5*(7), 621–627. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00096-0)
14. Chen, W., Epshtein, Y., Vagts, C., Cress, A. E., & Jacobson, J. R. (2025). Increased Kindlin-2 via SMURF1 Inhibition Attenuates Endothelial Permeability and Acute Lung Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(5). <https://doi.org/10.3390/ijms26051880>
15. Chesarino, N. M., McMichael, T. M., & Yount, J. S. (2015). E3 Ubiquitin Ligase NEDD4 Promotes Influenza Virus Infection by Decreasing Levels of the Antiviral Protein IFITM3. *PLoS Pathogens*, *11*(8), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005095>
16. Clare, B. (2021). Inflammasome activation by Salmonella. *Current Opinion in Microbiology*, *64*, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.004>
17. Clough, J. D. (2018). Immune recognition. *Suppressor Cells and Their Factors*, 3–20. <https://doi.org/10.1201/9781351077026>
18. Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). Salmonella, the host and disease: A brief review. *Immunology and Cell Biology*, *85*(2), 112–118. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>
19. d’Azzo, A., Bongiovanni, A., & Nastasi, T. (2005). E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. *Traffic*, *6*(6), 429–441. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00294.x>
20. Drecktrah, D., Knodler, L. A., Ireland, R., & Steele-mortimer, O. (2006). *The Mechanism of Salmonella Entry Determines the Vacuolar Environment and Intracellular Gene Expression*. 39–51. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00360.x>
21. Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, *8*(3), 284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
22. Fang, F. C., & Vázquez-Torres, A. (2019). Reactive nitrogen species in host–bacterial interactions. *Current Opinion in Immunology*, *60*, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.05.008>
23. Fang, Z., & Méresse, S. (2022). Endomembrane remodeling and dynamics in Salmonella infection.

- Microbial Cell*, 9(2), 24–41. <https://doi.org/10.15698/mic2022.02.769>
24. Franco, L. H., Nair, V. R., Scharn, C. R., Xavier, R. J., Torrealba, J. R., Shiloh, M. U., & Levine, B. (2017). The Ubiquitin Ligase Smurf1 Functions in Selective Autophagy of Mycobacterium tuberculosis and Anti-tuberculous Host Defense. *Cell Host and Microbe*, 21(1), 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.11.002>
 25. Galán, J. E. (2021). Salmonella Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair. *Nature Reviews Microbiology*, 19(11), 716–725. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00561-4>
 26. Geddes, K., Cruz, F., & Heffron, F. (2007). Analysis of cells targeted by Salmonella type III secretion in vivo. *PLoS Pathogens*, 3(12), 2017–2028. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030196>
 27. Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2008). Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. *Methods in Enzymology*, 440(07), 361–380. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)00823-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)00823-3)
 28. Grumati, P., & Dikic, I. (2018). Ubiquitin signaling and autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 293(15), 5404–5413. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000117>
 29. Han, X., Allaire, J. M., Crowley, S. M., Chan, J. J., Lau, K., Zhang, C., Hirota, S. A., Bergstrom, K., Knodler, L. A., & Vallance, B. A. (2024). Inflammasome activation links enteric Salmonella Typhimurium infection to a rapid, cytokine-dependent increase in intestinal mucin release. *Gut Microbes*, 16(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2413372>
 30. Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 53–66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>
 31. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., & Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/35074106>
 32. Herhaus, L., & Dikic, I. (2018). Regulation of Salmonella-host cell interactions via the ubiquitin system. *International Journal of Medical Microbiology*, 308(1), 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.003>
 33. Hu, H., & Sun, S. C. (2016). Ubiquitin signaling in immune responses. *Cell Research*, 26(4), 457–483. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.40>
 34. Hueffer, K., & Galán, J. E. (2004). *Microreview Salmonella -induced macrophage death : multiple mechanisms , different outcomes*. 6, 1019–1025. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00451.x>
 35. Hurley, D., McCusker, M. P., Fanning, S., & Martins, M. (2014). Salmonella-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00481>
 36. Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), 343–353. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>
 37. Jensen, K., Gallagher, I. J., Kaliszewska, A., Zhang, C., Abejide, O., Gallagher, M. P., Werling, D., & Glass, E. J. (2016). Live and inactivated Salmonella enterica serovar Typhimurium stimulate similar but distinct transcriptome profiles in bovine macrophages and dendritic cells. *Veterinary Research*, 47(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0328-y>
 38. Jepson, M. A., Kenny, B., & Leard, A. D. (2001). Role of sipA in the early stages of Salmonella typhimurium entry into epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 3(6), 417–426. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00124.x>
 39. Jiang, F., Yang, Y., Ni, Y., Qin, Y., Yuan, F., Ju, R., & Wu, M. (2024). Smurf1 Modulates Smad Signaling Pathway in Fibrotic Cataract Formation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 65(2). <https://doi.org/10.1167/iovs.65.2.18>
 40. Jiang, L., Li, W., Hou, X., Ma, S., Wang, X., Yan, X., Yang, B., Huang, D., Liu, B., & Feng, L. (2023). Nitric oxide is a host cue for Salmonella Typhimurium systemic infection in mice. *Communications Biology*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04876-1>
 41. Kalupahana, R. S., Mastroeni, P., Maskell, D., & Blacklaws, B. A. (2005). Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Immunology*, 115(4), 462–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02180.x>
 42. Kaneki, H., Guo, R., Chen, D., Yao, Z., Schwarz, E. M., Zhang, Y. E., Boyce, B. F., & Xing, L. (2006). Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4326–4333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509430200>
 43. Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 13(5), 816–825. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>
 44. Keestra-Gounder, A. M., Tsolis, R. M., & Bäuml, A. J. (2015). Now you see me, now you don't: the

- interaction of Salmonella with innate immune receptors. *Nature Reviews Microbiology*, 13(4), 206–216. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3428>
45. Kim, J. Bin, Kim, S. Y., Kim, B. M., Lee, H., Kim, I., Yun, J., Jo, Y., Oh, T., Jo, Y., Chae, H. D., & Shin, D. Y. (2013). Identification of a novel anti-apoptotic E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates antagonists of inhibitor of apoptosis proteins SMAC, HtrA2, and ARTS. *Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 12014–12021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436113>
 46. Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., & Moilanen, E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, 4(4), 471–479. <https://doi.org/10.2174/1568010054526359>
 47. Kwei, K. A., Shain, A. H., Bair, R., Montgomery, K., Karikari, C. A., van de Rijn, M., Hidalgo, M., Maitra, A., Bashyam, M. D., & Pollack, J. R. (2011). SMURF1 amplification promotes invasiveness in pancreatic cancer. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023924>
 48. Laney, J. D., & Hochstrasser, M. (1999). Substrate Targeting Minireview in the Ubiquitin System The following model has emerged for the signal-Figure 1. Model for the Phosphorylation-Dependent Degradation of IB and Comparison of-TrCP Recognition Elements. *Cell*, 97, 427–430.
 49. Lee, Y. S., Park, J. S., Kim, J. H., Jung, S. M., Lee, J. Y., Kim, S. J., & Park, S. H. (2011). Smad6-specific recruitment of Smurf E3 ligases mediates TGF- β 1-induced degradation of MyD88 in TLR4 signalling. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1469>
 50. Li, D., Wei, T. T., Cai, J., Xie, T. H., Yao, Y., & Zhu, L. (2023). Smurf1: A possible therapeutic target in dry age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 233(February), 109549. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2023.109549>
 51. Li, Y. T., Yu, C. B., Yan, D., Huang, J. R., & Li, L. J. (2016). Effects of Salmonella infection on hepatic damage following acute liver injury in rats. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, 15(4), 399–405. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(16\)60113-3](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(16)60113-3)
 52. Lin, W., Zhang, X., Zhang, C., Li, L., Zhang, J., Xie, P., Zhan, Y., & An, W. (2022). Deletion of Smurf1 attenuates liver steatosis via stabilization of p53. *Laboratory Investigation*, 102(10), 1075–1087. <https://doi.org/10.1038/s41374-022-00802-x>
 53. Mallette, F. A., & Richard, S. (2012). K48-linked ubiquitination and protein degradation regulate 53BP1 recruitment at DNA damage sites. *Cell Research*, 22(8), 1221–1223. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.58>
 54. Manzanillo, P. S., Ayres, J. S., Watson, R. O., Collins, A. C., Souza, G., Rae, C. S., Schneider, D. S., Nakamura, K., Shiloh, M. U., & Cox, J. S. (2013). The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature*, 501(7468), 512–516. <https://doi.org/10.1038/nature12566>
 55. Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular Cell*, 10(2), 417–426. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)
 56. Mastroeni, P., Grant, A., Restif, O., & Maskell, D. (2009). *The Gram-negative bacterium Salmonella enterica causes a range of life-threatening diseases in humans and animals worldwide*. 7(jANuARY), 73–80. www.nature.com/reviews/micro
 57. Meng, K., Yang, J., Xue, J., Lv, J., Zhu, P., Shi, L., & Li, S. (2023). A host E3 ubiquitin ligase regulates Salmonella virulence by targeting an SPI-2 effector involved in SIF biogenesis. *MLife*, 2(2), 141–158. <https://doi.org/10.1002/mlf2.12063>
 58. Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>
 59. Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., & Tanaka, K. (2016). The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- κ B Signaling. *Molecular Cell*, 64(2), 251–266. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.014>
 60. Oppenheim, J. J., Biragyn, A., Kwak, L. W., & Yang, D. (2003). Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(SUPPL. 2), 17–21. https://doi.org/10.1136/ard.62.suppl_2.ii17
 61. Orvedahl, A., Sumpter, R., Xiao, G., Ng, A., Zou, Z., Tang, Y., Narimatsu, M., Gilpin, C., Sun, Q., Roth, M., Forst, C. V., Wrana, J. L., Zhang, Y. E., Luby-Phelps, K., Xavier, R. J., Xie, Y., & Levine, B. (2011). Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. *Nature*, 480(7375), 113–117. <https://doi.org/10.1038/nature10546>
 62. Otten, E. G., Werner, E., Crespillo-Casado, A., Boyle, K. B., Dharamdasani, V., Pathe, C., Santhanam, B., & Randow, F. (2021). Ubiquitylation of lipopolysaccharide by RNF213 during bacterial infection. *Nature*, 594(7861), 111–116. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03566-4>
 63. Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>


64. Peng, Z., Yue, Y., & Xiong, S. (2022). Mycobacterial PPE36 Modulates Host Inflammation by Promoting E3 Ligase Smurf1-Mediated MyD88 Degradation. *Frontiers in Immunology*, *13*(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.690667>
65. Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry*, *70*, 503–533.
66. Plowden, J., Renshaw-Hoelscher, M., Engleman, C., Katz, J., & Sambhara, S. (2004). Innate immunity in aging: Impact on macrophage function. *Aging Cell*, *3*(4), 161–167. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00102.x>
67. Qian, G., Ren, Y., Zuo, Y., Yuan, Y., Zhao, P., Wang, X., Cheng, Q., Liu, J., Zhang, L., Guo, T., Liu, C., & Zheng, H. (2016). Smurf1 represses TNF- α production through ubiquitination and destabilization of USP5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *474*(3), 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.135>
68. Roh, J. D., Hobson, R., Chaudhari, V., Quintero, P., Yeri, A., Benson, M., Xiao, C., Zlotoff, D., Bezzerides, V., Houstis, N., Platt, C., Damilano, F., Lindman, B. R., Elmariah, S., Biersmith, M., Lee, S. J., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Gerszten, R. E., ... Rosenzweig, A. (2019). Activin type II receptor signaling in cardiac aging and heart failure. *Science Translational Medicine*, *11*(482), 1–16. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau8680>
69. Rothman, A. M. K., Florentin, A., Zink, F., Quigley, C., Bonneau, O., Hemmig, R., Hachey, A., Rejtar, T., Thaker, M., Jain, R., Huang, S. M., Sutton, D., Roger, J., Zhang, J. H., Weiler, S., Cotesta, S., Ottl, J., Srivastava, S., Kordonsky, A., ... Rowlands, D. J. (2025). Therapeutic potential of allosteric HECT E3 ligase inhibition. *Cell*, *188*(10), 2603–2620.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2025.03.001>
70. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, *75*(2), 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
71. Sharma, V., Verma, S., Seranova, E., Sarkar, S., & Kumar, D. (2018). Selective autophagy and xenophagy in infection and disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*(NOV), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00147>
72. Smit, J. J., Sixma, T. K., Irp, H., & Ring, I. (2014). RBR E3 -ligases at work. *EMBO Reports*, *15*(2), 142–154.
73. Souza-Costa, Luiz P., Santos, F. R. S., Pimenta, J. C., Queiroz-Junior, C. M., Tana, F. L., Teixeira, D. C., Couto, M. G. G., Oliveira, N. F. M., Pereira, R. D., Beltrami, V. A., Costa, P. A. C., Lacerda, L. S. B., Andrade-Chaves, J. T., Guimarães, P. P. G., Aguiar, R. S., Teixeira, M. M., Costa, V. V., & Franco, L. H. (2024). E3 Ubiquitin Ligase Smurf1 Regulates the Inflammatory Response in Macrophages and Attenuates Hepatic Damage during Betacoronavirus Infection. *Pathogens*, *13*(10). <https://doi.org/10.3390/pathogens13100871>
74. Souza-Costa, Luiz Pedro, Andrade-Chaves, J. T., Andrade, J. M., Costa, V. V., & Franco, L. H. (2023). Uncovering new insights into the role of the ubiquitin ligase Smurf1 on the regulation of innate immune signaling and resistance to infection. *Frontiers in Immunology*, *14*(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1185741>
75. Souza, D. G., Soares, A. C., Pinho, V., Torloni, H., Reis, L. F. L., Martins, M. T., & Dias, A. A. M. (2002). Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *American Journal of Pathology*, *160*(5), 1755–1765. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61122-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61122-4)
76. Sun, L., & Chen, Z. J. (2004). The novel functions of ubiquitination in signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, *16*(2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.02.005>
77. Suzuki, A., Shibata, T., Shimada, Y., Murakami, Y., Horii, A., Shiratori, K., Hirohashi, S., Inazawa, J., & Imoto, I. (2008). Identification of SMURF1 as a possible target for 7q21.3-22.1 amplification detected in a pancreatic cancer cell line by in-house array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Science*, *99*(5), 986–994. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00779.x>
78. Tripathi-Giesgen, I., Behrends, C., & Alpi, A. F. (2021). The ubiquitin ligation machinery in the defense against bacterial pathogens. *EMBO Reports*, *22*(11), 1–19. <https://doi.org/10.15252/embr.202152864>
79. Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 SUPPL. 2), S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
80. Wang, H. R., Ogunjimi, A. A., Zhang, Y., Ozdamar, B., Bose, R., & Wrana, J. L. (2006). Degradation of RhoA by Smurf1 ubiquitin ligase. *Methods in Enzymology*, *406*(1987), 437–447. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)06032-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)06032-0)
81. Wang, H. R., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, A. A., Alexandrova, E., Thomsen, G. H., & Wrana, J. L. (2003). Regulation of Cell Polarity and Protrusion Formation by Targeting RhoA for Degradation.

- Science*, 302(5651), 1775–1779. <https://doi.org/10.1126/science.1090772>
82. Wang, Y., Tong, X., & Ye, X. (2012). Ndfip1 Negatively Regulates RIG-I-Dependent Immune Signaling by Enhancing E3 Ligase Smurf1-Mediated MAVS Degradation. *The Journal of Immunology*, 189(11), 5304–5313. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201445>
 83. Weiss, D. S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S., & Zychlinsky, A. (2004). Toll-Like Receptors Are Temporally Involved in Host Defense. *The Journal of Immunology*, 172(7), 4463–4469. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.4463>
 84. Welchman, R. L., Gordon, C., & Mayer, R. J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(8), 599–609. <https://doi.org/10.1038/nrm1700>
 85. Wen, M., Ma, X., Cheng, H., Jiang, W., Xu, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Guo, Z., Yu, Y., Xu, H., Qian, C., Cao, X., & An, H. (2015). Stk38 protein kinase preferentially inhibits TLR9-activated inflammatory responses by promoting MEKK2 ubiquitination in macrophages. *Nature Communications*, 6(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms8167>
 86. Wu, J., Pugh, R., Laughlin, R. C., Andrews-Polymenis, H., McClelland, M., Bäumlner, A. J., & Adams, L. G. (2014). High-throughput assay to phenotype salmonella enterica typhimurium association, invasion, and replication in macrophages. *Journal of Visualized Experiments*, 90, 1–7. <https://doi.org/10.3791/51759>
 87. Xia, Q., Li, Y., Han, D., & Dong, L. (2021). SMURF1, a promoter of tumor cell progression? *Cancer Gene Therapy*, 28(6), 551–565. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-00255-8>
 88. Yamashita, M., Ying, S. X., Zhang, G. M., Li, C., Cheng, S. Y., Deng, C. X., & Zhang, Y. E. (2005). Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by targeting MEKK2 for degradation. *Cell*, 121(1), 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.035>
 89. Yang, W., Bai, X., Luan, X., Min, J., Tian, X., Li, H., Li, H., Sun, W., Liu, W., Fan, W., Liu, W., & Sun, L. (2022). Delicate regulation of IL-1 β -mediated inflammation by cyclophilin A. *Cell Reports*, 38(11), 110513. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110513>
 90. Yuan, C., Qi, J., Zhao, X., & Gao, C. (2012). Smurf1 protein negatively regulates interferon- γ signaling through promoting STAT1 protein ubiquitination and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(21), 17006–17015. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341198>
 91. Zaru, R. (2020). Pattern recognition receptors ligands Category: Receptors and Molecules. *British Society for Immunology*, 1–2. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/receptors-and-molecules/pattern-recognition-receptor-prrs>
 92. Zhang, D., Facchinetti, V., Wang, X., Huang, Q., Qin, J., & Su, B. (2006). Identification of MEKK2/3 serine phosphorylation site targeted by the Toll-like receptor and stress pathways. *EMBO Journal*, 25(1), 97–107. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600913>
 93. Zhang, Y., Wang, C., Cao, Y., Gu, Y., & Zhang, L. (2017). Selective compounds enhance osteoblastic activity by targeting HECT domain of ubiquitin ligase Smurf1. *Oncotarget*, 8(31), 50521–50533. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10648>
 94. Zhao, M., Qiao, M., Oyajobi, B. O., Mundy, G. R., & Chen, D. (2003). E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor α 1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27939–27944. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304132200>
 95. Zhou, Y., & Zhu, Y. (2015). Diversity of bacterial manipulation of the host ubiquitin pathways. *Cellular Microbiology*, 17(1), 26–34. <https://doi.org/10.1111/cmi.12384>
 96. Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J. L., & Thomsen, G. H. (1999). A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, 400(6745), 687–693. <https://doi.org/10.1038/23293>

ANEXOS

frontiers | Frontiers in Immunology

TYPE Review
PUBLISHED 09 May 2023
DOI: 10.3389/fimmu.2023.1185741

 Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Sergio C. Oliveira,
University of São Paulo, Brazil

REVIEWED BY
Guillermo Herán (Gambartolomei),
National Scientific and Technical Research
Council (CONICET), Argentina
Lei Jin,
University of Florida, United States

*CORRESPONDENCE
Luiz Henrique Franco
lfranco@icb.ufmg.br

[†]These authors have contributed
equally to this work

RECEIVED 13 March 2023
ACCEPTED 28 March 2023
PUBLISHED 09 May 2023

CITATION
Souza-Costa LP, Andrade-Chaves JT,
Andrade JM, Costa VV and Franco LH
(2023) Uncovering new insights into the
role of the ubiquitin ligase Smurf1 on the
regulation of innate immune signaling
and resistance to infection.
Front. Immunol. 14:1185741.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1185741

COPYRIGHT
© 2023 Souza-Costa, Andrade-Chaves,
Andrade, Costa and Franco. This is an open-
access article distributed under the terms of
the [Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Uncovering new insights into the role of the ubiquitin ligase Smurf1 on the regulation of innate immune signaling and resistance to infection









Luiz Pedro Souza-Costa^{1†}, Josiane Teixeira Andrade-Chaves^{1†},
Juvana Moreira Andrade², Vivian Vasconcelos Costa²
and Luis Henrique Franco^{3*}

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ²Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Innate immunity is the body's first line of defense against infections. Innate immune cells express pattern recognition receptors in distinct cellular compartments that are responsible to detect either pathogens-associated molecules or cellular components derived from damaged cells, to trigger intracellular signaling pathways that lead to the activation of inflammatory responses. Inflammation is essential to coordinate immune cell recruitment, pathogen elimination and to keep normal tissue homeostasis. However, uncontrolled, misplaced or aberrant inflammatory responses could lead to tissue damage and drive chronic inflammatory diseases and autoimmunity. In this context, molecular mechanisms that tightly regulate the expression of molecules required for the signaling of innate immune receptors are crucial to prevent pathological immune responses. In this review, we discuss the ubiquitination process and its importance in the regulation of innate immune signaling and inflammation. Then, we summarize the roles of Smurf1, a protein that works on ubiquitination, on the regulation of innate immune signaling and antimicrobial mechanisms, emphasizing its substrates and highlighting its potential as a therapeutic target for infectious and inflammatory conditions.

Article

E3 Ubiquitin Ligase Smurf1 Regulates the Inflammatory Response in Macrophages and Attenuates Hepatic Damage during Betacoronavirus Infection

Luiz P. Souza-Costa ¹ , Felipe R. S. Santos ¹ , Jordane C. Pimenta ², Celso M. Queiroz-Junior ², Fernanda L. Tana ¹, Danielle C. Teixeira ², Manoela G. G. Couto ², Natalia E. M. Oliveira ¹, Rafaela D. Pereira ¹, Vinicius A. Beltrami ², Pedro A. C. Costa ³ , Larisse S. B. Lacerda ², Josiane T. Andrade-Chaves ¹, Pedro P. G. Guimarães ³ , Renato S. Aguiar ⁴ , Mauro M. Teixeira ¹ , Vivian V. Costa ²  and Luis H. Franco ^{1,*} 

¹ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; souzaluizpedro@gmail.com (L.P.S.-C.)

² Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

³ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

⁴ Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

* Correspondence: luisfranco@icb.ufmg.br; Tel: +55-31-3409-2666



Citation: Souza-Costa, L.P.; Santos, F.R.S.; Pimenta, J.C.; Queiroz-Junior, C.M.; Tana, F.L.; Teixeira, D.C.; Couto, M.G.G.; Oliveira, N.E.M.; Pereira, R.D.; Beltrami, V.A.; et al. E3 Ubiquitin Ligase Smurf1 Regulates the Inflammatory Response in Macrophages and Attenuates Hepatic Damage during Betacoronavirus Infection. *Pathogens* 2024, 13, 871. <https://doi.org/10.3390/pathogens13100871>

Academic Editor: Luis Martínez-Sobrido

Received: 16 August 2024
Revised: 27 September 2024
Accepted: 1 October 2024
Published: 3 October 2024

Abstract: The E3 ubiquitin ligase Smurf1 catalyzes the ubiquitination and proteasomal degradation of several protein substrates related to inflammatory responses and antiviral signaling. This study investigated the role of Smurf1 in modulating inflammation induced by Betacoronavirus infection. Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from C57BL/6 (wild-type) or Smurf1-deficient (*Smurf1*^{-/-}) mice were infected with MHV-A59 to evaluate the inflammatory response in vitro. Smurf1 was found to be required to downregulate the macrophage production of pro-inflammatory mediators, including TNF and CXCL1; to control viral release from infected cells; and to increase cell viability. To assess the impact of Smurf1 in vivo, we evaluated the infection of mice with MHV-A59 through the intranasal route. *Smurf1*^{-/-} mice infected with a lethal inoculum of MHV-A59 succumbed earlier to infection. Intranasal inoculation with a 10-fold lower dose of MHV-A59 resulted in hematological parameter alterations in *Smurf1*^{-/-} mice suggestive of exacerbated systemic inflammation. In the lung parenchyma, Smurf1 expression was essential to promote viral clearance, downregulating IFN- β mRNA and controlling the inflammatory profile of macrophages and neutrophils. Conversely, Smurf1 did not affect IFN- β mRNA regulation in the liver, but it was required to increase TNF and iNOS expression in neutrophils and decrease TNF expression in macrophages. In addition, *Smurf1*^{-/-} mice exhibited augmented liver injuries, accompanied by high serum levels of alanine aminotransferase (ALT). These findings suggest that Smurf1 plays a critical role in regulating the inflammatory response in macrophages and attenuating systemic inflammation during Betacoronavirus infection.

Keywords: Smurf1; Betacoronavirus; MHV-A59; inflammation; macrophages

Disruption of Host E3 Ubiquitin Ligase Smurf1 Promotes Resistance to *Salmonella* by Enhancing Bacterial Clearance and Limiting Inflammatory Tissue Damage

Josiane Teixeira de Andrade-Chaves¹, Wesley Teodoro dos Reis¹, Luiz Pedro Souza-Costa¹, Lizbeth Sally Vidca Machaca¹, Fernanda de Lima Tana², Jefferson Bruno Soares Oliveira³, Márcio Sobreira Silva Araújo⁴, Olindo Assis Martins-Filho⁴, Tatiane Alves da Paixão³, Vivian Vasconcelos Costa², Luis Henrique Franco^{1*}

1. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brazil

2. Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brazil

3. Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brazil

4. Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ Minas, Belo Horizonte, Brazil

* Corresponding author:

Luis Henrique Franco, Ph.D.

Phone: +55 31 3409 2666

luisfranco@icb.ufmg.br

Abstract

Background

Smurf1 is an E3 ubiquitin ligase involved in a wide range of biological processes, including cell development and migration, bone formation, cancer progression, and immune responses. Smurf1 has been shown to play a role in host resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection, as well as in the regulation of inflammatory responses and tissue damage during Betacoronavirus infection.

This is a new page that we are continually improving.
We would love to hear your feedback and suggestions.



Inflammation Research



Account

Disruption of Host E3 Ubiquitin Ligase Smurf1 Promotes Resistance to *Salmonella* by Enhancing Bacterial Clearance and Limiting Inflammatory Tissue Damage

Current status

We've received your submission and are now running technical checks

We are checking your submission against our journal guidelines and policies. If there is anything we need we will email luisfranco@icb.ufmg.br

Progress so far

Progress so far

1. Submission received - complete
2. Technical check - in progress

[Learn about our submission process](#)

Your submission

Your submission

Inflammation Research

Submission ID

3d93b7be-f652-4326-b702-c92f4e1f1e83

Submission version

v.1.0

Manuscript File

[Andrade-Chaves_et_al.docx](#)

Submission history

1. Submission received

Submission status Date

Submission received 01 Aug 2025

2. Technical check

Submission status Date

Submission is under technical check 01 Aug 2025