

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

Josiane Teixeira de Andrade Chaves

**Participação da ubiquitina-ligase SMURF1 na  
sinalização da resposta inata e na resistência do  
hospedeiro contra infecções bacterianas**

**BELO HORIZONTE**

**2021**

Josiane Teixeira de Andrade Chaves

**Participação da ubiquitina-ligase SMURF1 na  
sinalização da resposta inata e na resistência do  
hospedeiro contra infecções bacterianas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

**Prof. Dr. Luís Henrique Franco (Orientador)**

Laboratório de Imunidade Inata

Universidade Federal de Minas Gerais

**BELO HORIZONTE — MG**

**2021**

043 Chaves, Josiane Teixeira de Andrade.  
Participação da ubiquitina-ligase Smurf1 na sinalização da resposta imune inata e na resistência do hospedeiro contra infecções bacterianas [manuscrito] / Josiane Teixeira de Andrade Chaves. - 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Franco.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Resposta imune. 3. Inflamação. 4. Infecções Bacterianas. I. Franco, Luís Henrique. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JOSIANE TEIXEIRA DE ANDRADE CHAVES.


Aos dez dias do mês de setembro de 2021 às 13:00 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 dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Participação da ubiquitina-ligase Smurf1 na sinalização da resposta imune inata e na resistência do hospedeiro contra infecções bacterianas", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: 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), aprovada; Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Luis Henrique Franco - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

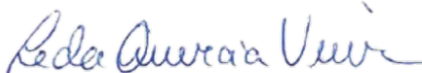
- APROVADA  
 REPROVADA

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, 10 de setembro de 2021.

Dra. Priscila Carneiro Campos (University of Texas Southwestern) 

Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG) 

Dr. Luis Henrique Franco - Orientador (UFMG) 



Profª Leda Quercia Vieira  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
em Bioquímica e Imunologia

À minha família, **Carlos e Helena**, meu alicerce e amor incondicional.

Ao meu orientador, **Professor Luís**, pela atenção e apoio constantes.  
Com vocês, o caminho foi mais alegre e um sonho se tornou realidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por me apoiarem e estarem sempre presentes. Em especial ao Carlos e Helena, por todo amor, compreensão, suporte e acreditarem junto comigo que este sonho seria possível. Minha vida são vocês!

À minha rede de apoio, Luciene, Letícia, Vitória, Vera Chaves e Arthur por cuidarem de Helena enquanto estava ausente, realizando experimentos ou estudando.

Ao meu querido orientador, Professor Luis, pela confiança e motivação durante esse trabalho. Ser sua aluna é um privilégio. Lembrarei sempre e com muito carinho de seus ensinamentos. Além de um excelente professor e pesquisador, seu caráter, dedicação e valores o levarão a grandes conquistas em sua carreira. Este foi apenas o primeiro passo. Muito obrigado professor!

Ao professor Rafael Vieira, um dos primeiros pesquisadores do programa que tive contato, pela confiança e apoio quando ainda participava do processo seletivo. Ao amigo Dr. Marcus Vinícius Bolivar Malachias por me encorajar em participar da seleção de mestrado.

Aos professores Leda Quércia, Patiu Horta, Flávio Amaral, Dawidson Gomes, Mariana Quezado, Sérgio Costa, Erick Tahara e Jader Cruz por todo apoio durante a realização deste trabalho. Literalmente abriram as portas de seus laboratórios a fim de termos condições técnicas para realizar os experimentos.

Aos professores Carlos Renato, Ana Caetano, Liza Felicori, Angélica Thomaz, Carlos Chávez, Flaviano Santos Martins, Renato Santana e Vivian Vasconcelos, que colaboraram no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos colegas do nosso grupo, Danielle, Ana Luiza e Luiz Pedro pelo apoio e ensinamentos compartilhados. Ao Celso Martins, PhD, por me auxiliar no experimento *in vivo*. Aos colegas que fiz durante estes 2 anos, Gabi, Filipe, Laís, Cristina, Mariana, Vivi, Paula, Dani, Wellington, Léo. E, em especial, à Verônica Santana por me escutar, apoiar e ensinar.

Agradecimento especial aos membros da banca, Prof. Dr. Flávio Amaral, Prof. Dra. Priscila Campos e Prof. Dr. Fábio Marinho, pela disponibilidade e por contribuírem com seus conhecimentos e orientações. Muito obrigada.

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Alexandre e Orlando (*in memoriam*) por toda a atenção. Aos técnicos do Departamento, por estarem sempre disponíveis quando necessário.

Minha gratidão a Deus, meu protetor e guia, por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho. Tenham a certeza de que carregarei com alegria os frutos dessa linda história.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)



## RESUMO

A inflamação é um componente essencial da imunidade inata desencadeada durante infecções bacterianas. Células da imunidade inata utilizam de diversos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR), incluindo a família de receptores do Tipo Toll (TLR) para detectar os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP). Uma vez ativadas por componentes bacterianos, as células da imunidade inata respondem através da secreção de citocinas inflamatórias e expressão de mecanismos microbicidas importantes no controle inicial da infecção. Enquanto o controle apropriado da resposta imune inata é importante no combate a infecções bacterianas, uma resposta exacerbada pode levar a danos teciduais e a uma variedade de condições patológicas como câncer, doenças autoimunes e choque séptico. Trabalhos prévios demonstraram que Smurf1, uma E3 ubiquitina-ligase, desempenha um papel importante em regular a resposta imune e a resistência do hospedeiro contra infecções bacterianas. Além disso, outros estudos evidenciaram que Smurf1 direciona para degradação proteossomal diversos substratos importantes na sinalização do sistema imune. Porém, o papel de Smurf1 na regulação da resposta imune contra infecções microbianas ainda não está totalmente esclarecido. Portanto, o objetivo deste trabalho é estudar o papel de Smurf1 na sinalização de receptores da imunidade inata em macrófagos e na resistência do hospedeiro contra infecções bacterianas. Nossos resultados mostraram que macrófagos Smurf1<sup>-/-</sup> apresentaram maior produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 e níveis de fosforilação aumentados de ERK1/2 após tratamento com LPS. Animais Smurf1<sup>-/-</sup> infectados com *Salmonella typhimurium* apresentaram números menores de bactérias replicativas no fígado em comparação com os animais WT e a análise histopatológica do fígado dos animais Smurf1<sup>-/-</sup> apresentou menor acometimento inflamatório. Esses resultados sugerem que Smurf1 pode atuar como um regulador negativo da ativação da via de ERK1/2 em macrófagos e desempenhar um papel importante na regulação da imunidade inata contra infecção por *Salmonella typhimurium*. Esse trabalho abre perspectivas para o desenvolvimento de terapias contra doenças infecciosas e inflamatórias.

**Palavras-chaves:** sinalização intracelular; Smurf1; regulação da resposta imune inata.

## ABSTRACT

Inflammation is an essential component of the innate immunity triggered during bacterial infections. Innate immunity cells utilize several Pattern Recognition Receptors (PRR), including Toll-like receptors (TLR), to detect pathogen-associated molecular patterns (PAMP). Once activated by bacterial components, innate immunity cells respond through the secretion of inflammatory cytokines and expression of microbicidal mechanisms important in the initial control of the infection. While proper control of the innate immune response is important in combating bacterial infections, an exacerbated response can lead to tissue damage and a variety of pathological conditions, such as cancer, autoimmune diseases, and septic shock. Previous research has shown that Smurf1, an E3 ubiquitin ligase, plays an important role in regulate the immune response and host resistance against bacterial infections. Furthermore, other studies have shown that Smurf1 directs several important substrates of immune system signaling to proteasomal degradation; however, its role in regulating the immune response against microbial infections is not fully understood. Therefore, this work aims at studying the role of Smurf1 in signaling innate immunity receptors in macrophages and in host resistance against bacterial infections. Our results indicate that Smurf1<sup>-/-</sup> macrophages showed higher TNF- $\alpha$  and IL-10 production and increased phosphorylation levels of ERK1/2 after LPS treatment. Smurf1<sup>-/-</sup> animals infected with *Salmonella typhimurium* showed lower numbers of replicative bacteria in the liver compared to the WT animals and the histopathological analysis of the liver of the animals showed less inflammatory involvement. These results suggest that Smurf1 may act as a negative regulator of ERK1/2 pathway activation in macrophages and plays an important role in regulating innate immunity against *Salmonella typhimurium* infection. Thus, this study opens new therapeutic prospects for treating infectious and inflammatory diseases.

**Keywords:** intracellular signaling; Smurf1; regulation of the innate immune response.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vias de sinalização mediadas por TLR.....	23
<b>Figura 2.</b> Processo de ubiquitinação .....	26
<b>Figura 3.</b> E3 Ligases do domínio HECT.....	27
<b>Figura 4.</b> Estrutura molecular de Smurf1 .....	29
<b>Figura 5.</b> Genotipagem de animais Smurf1 <sup>-/-</sup> .....	42
<b>Figura 6.</b> Dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-10 no sobrenadante de macrófagos tratados com LPS .....	44
<b>Figura 7.</b> Análise da ativação de ERK1/2 em macrófagos tratados com LPS .....	46
<b>Figura 8.</b> Análise da sobrevivência e massa corporal dos animais infectados com <i>S. typhimurium</i> .....	48
<b>Figura 9.</b> Escore clínico dos animais infectados com <i>S. typhimurium</i> .....	49
<b>Figura 10.</b> Contagem diferencial do número de células circulantes no sangue dos animais infectados com <i>S. typhimurium</i> .....	51
<b>Figura 11.</b> Análise da replicação bacteriana no fígado e baço dos animais infectados com <i>S. typhimurium</i> .....	53
<b>Figura 12.</b> Análise histopatológica do pulmão dos animais infectados com <i>S. typhimurium</i> .....	55
<b>Figura 13.</b> Análise histopatológica do fígado dos animais infectados com <i>S. typhimurium</i> .....	56
<b>Figura 14.</b> Quantificação dos achados histopatológicos dos animais infectados com <i>S. typhimurium</i> .....	57
<b>Figura 15.</b> Hipótese de trabalho .....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais Receptores de Reconhecimento Padrão responsáveis pelo reconhecimento de componentes bacterianos.....	19
<b>Tabela 2.</b> Sequência de primers para genotipagem Smurf1.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>CDSs</b>	Sensores de DNA citosólico
<b>CFU</b>	Unidades Formadoras de Colônia
<b>DAMPS</b>	Padrões Moleculares Associados ao Dano
<b>DMEM</b>	<i>Meio Dulbecco's Modified Eagle's</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucléico
<b>DUBs</b>	Enzimas desubiquitinases
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>ERK1/2</b>	<i>Extracellular signal-related kinase</i> (quinase relacionada com a sinalização extracelular)
<b>HEK</b>	<i>Human Embryonic Kidney</i> (linhagem de célula humana embrionária de rim)
<b>HECT</b>	<i>Homologus to the E6-AP Carboxy Terminus</i>
<b>GTPases</b>	Proteínas G pequenas
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon Gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IKK</b>	<i>I<math>\kappa</math>B kinase</i> (Quinase I $\kappa$ B)
<b>IRF</b>	<i>Interferon-regulatory Factor</i> (fator regulador de interferon)
<b>IRAK-4</b>	<i>IL-1-receptor associated kinase 4</i>
<b>JNK</b>	Quinase Jun
<b>K6</b>	Lisina 6
<b>K11</b>	Lisina 11
<b>K27</b>	Lisina 27
<b>K29</b>	Lisina 29
<b>K33</b>	Lisina 33
<b>K48</b>	Lisina 48
<b>K63</b>	Lisina 63
<b>LCCM</b>	Meio condicionado de células L929
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo

<b>MAPK</b>	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
<b>MyD88</b>	<i>Myeloid Differentiation Primary Response</i> (fator de diferenciação mielóide 88)
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator Nuclear $\kappa$ B
<b>NEMO</b>	<i>NF<math>\kappa</math>B essential modifier</i>
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NLR</b>	Receptores Tipo NOD
<b>p38</b>	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PAMPS</b>	Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salina)
<b>PCR</b>	Reação de Polimerização em Cadeia
<b>PRR</b>	Receptores de Reconhecimento Padrão
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RBR</b>	<i>Ring IBR-Ring Ligase</i>
<b>RIG-1</b>	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
<b>RING</b>	<i>Really Interesting New Gene</i>
<b>SMURF1</b>	<i>Smad Ubiquitination Regulation Factor 1</i>
<b>STAT1</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
<b>T3SS</b>	Sistema de secreção Tipo III
<b>TBK1</b>	<i>TANK-binding kinase 1</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator Transformador de crescimento- $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral
<b>TRAF3</b>	<i>TNF-<math>\alpha</math> receptor-associated factor</i>
<b>TRAF6</b>	<i>TNF-<math>\alpha</math> receptor associated factor 6</i>
<b>TRAM</b>	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
<b>TRIF</b>	<i>TIR domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like Receptors</i> (Receptores do Tipo Toll)
<b>Ub</b>	Ubiquitina
<b>WT</b>	<i>Wild-Type</i>
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro

<b>g</b>	Gramma
<b>ml</b>	Mililitro
<b><math>\alpha</math></b>	Alfha
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\kappa</math></b>	Kappa
<b><math>\gamma</math></b>	Gamma

# SUMÁRIO

1. Introdução -----	18
1.1.Imunidade inata e resistência contra infecções bacterianas .....	18
1.2.Receptores do Tipo Toll e imunidade antibacteriana .....	20
1.3.Ativação e Sinalização dos TLR.....	22
1.4.Ubiquitinação e Ubiquitina-Ligases .....	24
1.5.E3 UB-Ligase SMURF1 na Regulação da Resposta imune e Resistência à Infecções .....	28
2. OBJETIVOS -----	32
Objetivo geral: .....	32
Objetivos específicos: .....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS-----	33
3.1.Animais .....	33
3.2.Genotipagem dos Animais SMURF1-/- .....	33
3.3.Obtenção de Macrófagos e Tratamento com LPS .....	34
3.4.Dosagem das Citocinas .....	35
3.5.Western Blot .....	36
3.6.Infecção de Animais com S. typhimurium .....	37
3.7.Escore Clínico e Análise de Sobrevida .....	37
3.8.Análise de Parâmetros Sanguíneos dos Animais Infectados .....	39
3.9.Ensaio de Replicação Bacteriana no Fígado e Baço de Animais Infectados ...	39
3.10.Análise Histopatológica .....	40
3.11.Análises Estatísticas.....	40
4. Resultados -----	41
4.1.Genotipagem dos Animais SMURF1-/- .....	41



4.2.Dosagem de citocinas no Sobrenadante de Macrófagos Tratados com LPS ..	
43	
4.3.Avaliação da Ativação da Via ERK1/2 em Macrófagos Tratados com LPS ...	45
4.4.Análise do Escore Clínico e Sobrevida dos Animais Infectados .....	46
4.5.Contagem de Leucócitos na Circulação de Animais Infectados .....	50
4.6.Replicação Bacteriana no Fígado e Baço de Animais Infectados.....	52
4.7.Análise Histopatológica do Pulmão e Fígado dos Animais Infectados .....	54
5. Discussão .....	58
6. Conclusão.....	64
7. Bibliografia.....	65

## **1. Introdução**

---

### **1.1. Imunidade inata e resistência contra infecções bacterianas**

As bactérias são os microrganismos que mais frequentemente causam patologias no homem. Doenças como pneumonia, meningite, infecções gastrointestinais graves e outras enfermidades são causadas por bactérias. Em 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) fez um alerta sobre a necessidade do desenvolvimento de novas terapias que estimulem a resposta imunológica do paciente contra infecções bacterianas devido às dificuldades de progresso no desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos e ao surgimento de cepas resistente a múltiplas drogas (Antimicrobial Resistance Division & Partnership, 2020). Frente a uma possível infecção bacteriana o sistema imune dispõe de uma série de mecanismos fisiológicos com o objetivo de combater e eliminar esses microrganismos. Essa defesa imunológica é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e respostas tardias da imunidade adaptativa (Hoebe et al., 2004).

A imunidade inata caracteriza-se pela rápida resposta à infecção e contribui para a indução da resposta imune adaptativa. As células envolvidas na imunidade inata incluem macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e células NK (*natural killer*). Processos como fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do complemento, produção de citocinas e quimiocinas são característicos da resposta imune inata (Clough, 2018; Turvey & Broide, 2010). Além disso, o sistema imune inato também conta com barreiras físicas e químicas (por exemplo, o tecido epitelial que reveste o trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário) e peptídeos antimicrobianos para auxiliar na defesa do organismo. Os mecanismos imunes inatos atuam também na eliminação de células danificadas ou mortas resultantes do processo infeccioso, além de apresentar papel fundamental na resolução do processo inflamatório e restabelecimento da homeostasia tecidual (STUART E. TURVEY et al., 2009).

A detecção da presença de bactérias ou componentes bacterianos pelas células do sistema imune inato ocorre através do reconhecimento de Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMP) realizado pelos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR) (Zaru, 2020). Os PRR são receptores com a capacidade de reconhecerem uma ampla gama de componentes bacterianos, incluindo seu material genético e componentes de parede celular, e uma vez ativados sinalizam para o início da resposta imune inata. Além de componentes microbianos, o sistema imune inato também reconhece moléculas endógenas que são produzidas ou liberadas pelas células danificadas ou mortas. Essas moléculas são chamadas de DAMP (Padrões Moleculares Associados ao Dano). Assim, o sistema imune inato utiliza de seus PRR, presentes em diferentes componentes celulares, para reconhecer os PAMP e os DAMP (Akira et al., 2006; Turvey & Broide, 2010). Na Tabela 1 estão descritos os principais PRR expressos em células imunes inatas e que são responsáveis pelo reconhecimento de componentes bacterianos.

<b>FAMÍLIAS DE PRR IMPORTANTES NA IMUNIDADE ANTIBACTERIANA</b>		
<b>FAMÍLIA</b>	<b>LOCALIZAÇÃO</b>	<b>RECONHECIMENTO PAMP/DAMP</b>
TLR (Toll Like Receptors)	Membranas plasmáticas e membranas endossomais das células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células B, células endoteliais e outros tipos celulares	Várias moléculas microbianas, incluindo LPS bacteriano e peptidoglicanos.
NLR (Receptores Tipo NOD)	Citosol de fagócitos, células epiteliais e outras células	Peptidoglicanos da parede celular bacteriana.
CDSs (Sensores de DNA citosólico)	Citosol e muitos tipos celulares	DNA bacteriano

CLRs		Carboidratos da
Receptores de	Membranas plasmáticas de fagócitos	superfície microbiana
Lectina Tipo C		com terminal de manose e frutose
Receptores		Diacilglicerídios
Scavenger	Membrana plasmática de fagócitos	bacterianos

**Tabela 1. Principais PRR responsáveis pelo reconhecimento de componentes bacterianos.**

## 1.2. Receptores do Tipo Toll e imunidade antibacteriana

Dentre os diferentes tipos de PRR expressos pelas células da imunidade inata, destacamos os TLR (*Toll Like Receptors*) que reconhecem uma grande variedade de componentes bacterianos. Até o momento, foram identificados 11 membros da família TLR em humanos e 13 em camundongos, sendo que cada um é responsável em reconhecer diferentes PAMPs (Taro Kawai & Akira, 2010).

Os TLR são expressos em várias células imunes, incluindo macrófagos, células dendríticas, células B, tipos específicos de células T e até mesmo em células não imunes como fibroblastos e células epiteliais. Esses receptores estão presentes tanto em meio externo quanto intracelular. Os TLR 1, 2, 4, 5 e 6 são expressos nas membranas plasmáticas e atuam no reconhecimento de PAMP que estão presentes no meio extracelular. Já os tipos 3, 7, 8 e 9 são expressos nas membranas endossomais e no retículo endoplasmático e atuam no reconhecimento de PAMP liberados dentro desses compartimentos intracelulares (Taro Kawai & Akira, 2010).

Vários estudos evidenciam a importância dos TLR na defesa do organismo contra infecções bacterianas, sendo que o modelo experimental de infecção por *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) é um dos mais utilizados para estudos de imunidade inata (Korneev, 2019; Mathur et al., 2012; Santos et al., 2001).

*Salmonella* é uma bactéria flagelada gram-negativa, em forma de bastonete, que pertence à família Enterobacteriaceae. Cerca de 2.600 sorotipos diferentes de *Salmonella* já foram identificados e quase todas as cepas são patogênicas. Pessoas com o sistema imune comprometido (bebês, crianças menores de 5 anos e idosos) são as mais propensas a apresentarem sintomas graves. A *Salmonella* consegue invadir, se replicar e sobreviver em células hospedeiras humanas, causando diarreia, febre, fortes dores abdominais, calafrios, febre tifoide, intoxicação alimentar grave, choque séptico e pode até mesmo levar o indivíduo à morte, caso não receba tratamento em tempo hábil. Estudos já demonstram cepas resistentes aos antibióticos em uso, levando a uma preocupação mundial quanto ao aumento das taxas de mortalidade causadas por essa bactéria. Medidas preventivas como saneamento básico e restrição ao uso indiscriminado de antibióticos são as mais efetivas contra a salmonelose (Eng et al., 2015).

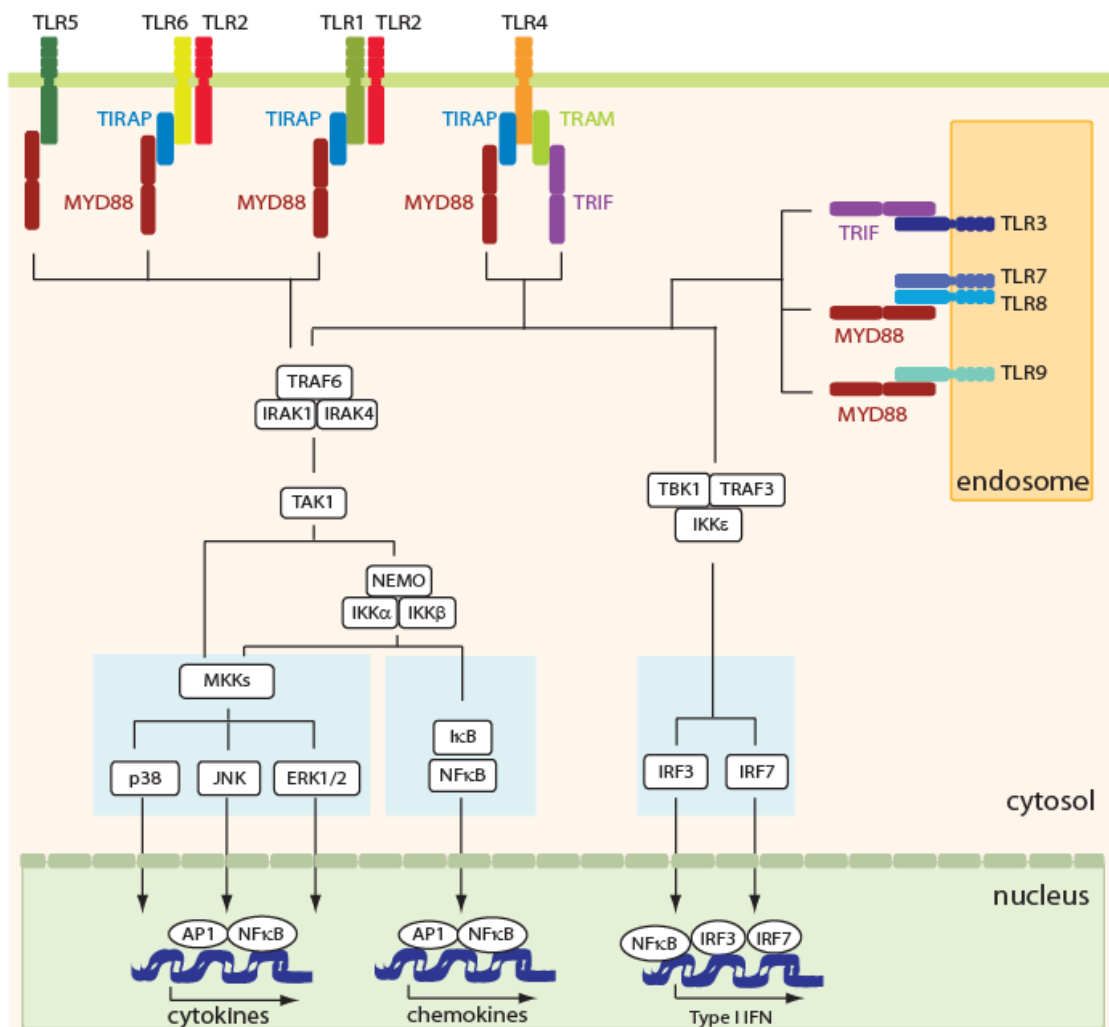
Dentre os diversos componentes da *S. typhimurium* envolvidos na ativação da resposta imune inata, destacamos o LPS, as flagelinas e lipoproteínas, que ativam diferentes TLR no organismo a fim de combater a infecção bacteriana (Broz et al., 2012).

O LPS, principal componente da membrana externa das salmonelas, é responsável pela ativação de TLR4 (S. T. Qureshi et al., 1999; Royle et al., 2003). Estudos já demonstraram que camundongos deficientes de TLR, especialmente do TLR4 e TLR2, são mais suscetíveis à infecção por *S. typhimurium* (Seibert et al., 2010; Weiss et al., 2004); as flagelinas, que são componentes estruturais do flagelo das salmonelas, são reconhecidas pelo TLR5 (Hajam et al., 2017); além disso, as proteínas de virulência T3SS presentes nas salmonelas são reconhecidas por outros tipos de PRR (Miao & Warren, 2010).

### 1.3. Ativação e Sinalização dos TLR

O reconhecimento dos componentes bacterianos pelos TLR resulta na ativação de vias de sinalização e fatores de transcrição, induzindo a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias e expressão de mecanismos microbicidas importantes no controle inicial da infecção. A ativação dos TLR por ligantes bacterianos ativa cascatas intracelulares distintas com o recrutamento de moléculas adaptadoras diferentes. Todos os TLR desencadeiam vias de sinalização dependentes de MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*), com exceção de TLR3 que sinaliza por uma via dependente de TRIF (*tir-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ) (T. Kawai & Akira, 2006). Além disso, a sinalização do TLR4 pode ocorrer tanto via TRIF quanto via MyD88 (Y. C. Lu et al., 2008; Peri et al., 2010).

A sinalização da via de MyD88, desencadeada pela ativação do TLR4, resulta na ativação de duas cascatas intracelulares e ativação de fatores de transcrição distintos, que migram para o núcleo e comandam a transcrição de genes relacionados com a ativação da imunidade inata. Nessa via, após a ativação de TLR4, MyD88 interage com a IRAK-4 (proteína quinase) e ativa outros membros da família IRAK, como IRAK-1. Esse processo resulta no recrutamento e ativação de TRAF6, o qual, em seguida, ativa o complexo contendo TAK1/TAB desencadeando as vias de sinalização MAPK e NF- $\kappa$ B. Na via de NF- $\kappa$ B, as proteínas IKK- $\beta$ , IKK- $\alpha$  e NEMO formam o complexo IKK que atuam na fosforilação de I $\kappa$ B- $\alpha$  para ser ubiquitinado e degradado, liberando NF- $\kappa$ B para se deslocar ao núcleo e iniciar a transcrição de genes de citocinas inflamatórias. Na via MAPK, a ativação do complexo TAK1/TAB resulta na ativação de quinases importantes na produção de citocinas, como ERK1/2, JNK1 e p38 (Figura 1) (Brown et al., 2011).



**Figura 1. Vias de sinalização mediadas por TLR.** A sinalização dos TLR ocorre via MyD88 ou TRIF e há posteriormente, a translocação de fatores de transcrição (NF- $\kappa$ B, AP-1 e IRFs) para o núcleo onde ativam a transcrição de genes envolvidos na produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e Interferon Tipo 1. A sinalização do TLR4, um dos principais receptores que reconhecem o LPS bacteriano, pode ocorrer tanto via TRIF quanto via MyD88. Adaptado de British Society for Immunology, 2009.

TLR4 também pode atuar de forma independente de MyD88 para produção de IFNs tipo I. Nessa situação, TLR4 requer a participação de TRAM para ativação de TRIF que se associa a TRAF3 ativando TBK1 e IKK $\epsilon$ , levando à translocação nuclear de IRF3 e à produção de IFN- $\beta$  (Brown et al., 2011; T. Kawai & Akira, 2006; Zaru, 2020). A ativação de TRAF3 está envolvida na produção de IFN tipo I e da citocina anti-inflamatória IL-10. Para a sinalização independente de MyD88, que envolve o TLR3, há o recrutamento de TRIF, após o reconhecimento do ligante e o desdobramento se assemelha à cascata do TLR4 descrita anteriormente para produção de IFN tipo I e IL-10 (British Society for Immunology, 2019; Brown et al., 2011).

Além da produção de citocinas inflamatórias, a sinalização dos TLR intracelulares também ativa a produção de moléculas efetoras como o óxido nítrico, prostaglandinas, proteínas de fase aguda, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos ou estimula mecanismos microbicidas como a xenofagia para auxiliarem na defesa do organismo contra infecções bacterianas (Oppenheim et al., 2003; Tyrrell, 2009; Z. Wang & Li, 2020).

#### **1.4. Ubiquitinação e Ubiquitina-Ligases**

O sistema imune inato é essencial para a defesa do organismo contra infecções bacterianas. As vias de sinalização intracelulares ativadas na resposta inata apresentam um funcionamento complexo e devem ser rigidamente controladas (Saitoh & Akira, 2010). As modificações pós-traducionais de proteínas estão envolvidas na regulação fisiológica de diversos processos imunes. Dentre esses mecanismos, destacamos o processo de ubiquitinação que direciona para a degradação proteossomal substratos alvos importantes do sistema inato para garantir a homeostasia imunológica (Bibeau-Poirier & Servant, 2008; Hu & Sun, 2016).

Ubiquitinação é um processo pós-traducional que consiste na ligação covalente de ubiquitina (Ub) a resíduos de lisina em proteínas-alvos. Proteínas ubiquitinadas são direcionadas para degradação proteossomal ou regulam a transdução de sinais da maioria dos receptores celulares (Finley & Chau, 1991). O processo de ubiquitinação é catalisado pela ação sequencial de três classes de enzimas: enzimas ativadoras de ubiquitina ou E1, importantes em promover a ativação da Ub livre no citoplasma; enzimas conjugadoras de ubiquitina ou E2, as quais recebem a Ub ativada por E1; e as enzimas ubiquitinas-ligases ou E3, as quais apresentam a função de transferir a Ub das enzimas E2 e promover a ligação específica ao substrato (Figura 2) (J. Li et al., 2016; Welchman et al., 2005).

Dentre as três etapas que ocorrem durante a ubiquitinação do substrato, as E3 ubiquitinas-ligases desempenham um papel essencial nesse processo. Essa classe de

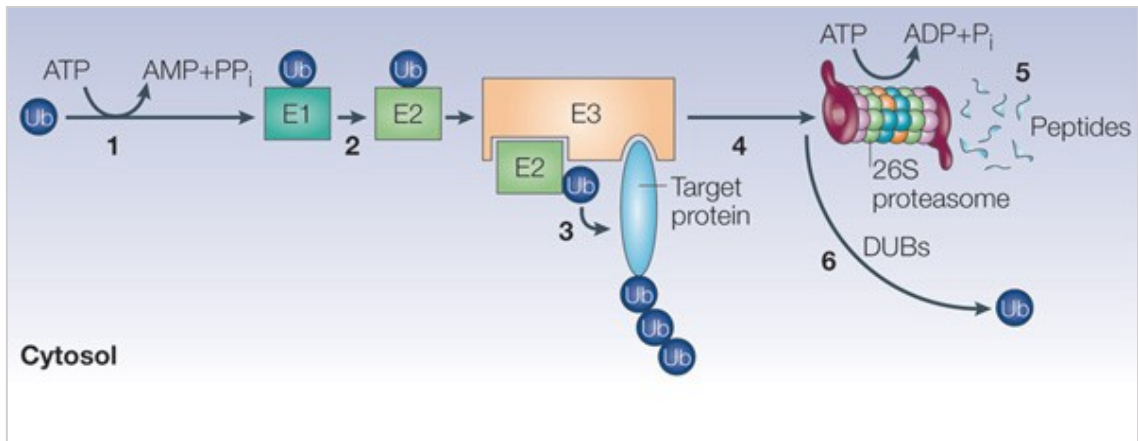


ubiquitina-ligases é responsável em garantir a especificidade de ligação da Ub a seu substrato (Weber et al., 2019). Por atuar em um ponto crítico da cascata de ubiquitinação, as E3 ubiquitinas-ligases têm atraído a atenção da indústria farmacêutica no desenvolvimento de medicamentos contra doenças tumorais (Nalepa et al., 2006; Petroski, 2008; Weber et al., 2019).

Durante o desdobramento do projeto genoma, foram encontradas aproximadamente 500 E3 ubiquitina-ligases, o que demonstra a importância dessa classe de proteínas nos processos celulares (Sun & Chen, 2004). Essas ubiquitina-ligases são agrupadas em categorias que se diferem em estrutura e mecanismos de ação, embora mantenham a mesma função de catalisar a ligação entre a Ub e seu substrato. As três classes são divididas da seguinte forma: RING (*really interesting new gene*), HECTs (*homologous to the E6-AP carboxy terminus*) e RBR (*ring-IBR-ring ligase*) (Smit et al., 2014).

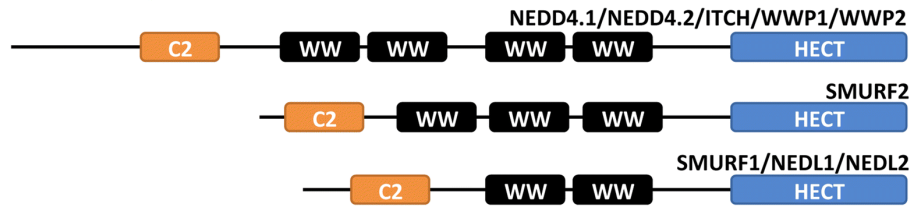
A família de E3-ligases que fazem parte da classe HECTs são formadas por aproximadamente 350 aminoácidos e estão descritos 28 tipos de HECTs em humanos divididos em três famílias: NEDD4 (9 membros), HERC (6 membros) e outros HECTs (13 membros) (Figura 3) (Sluimer & Distel, 2018). Dentre essas famílias, os membros pertencentes à NEDD4 são os mais estudados, principalmente quanto à estrutura molecular dessas enzimas (Fajner et al., 2017).

Além de enzimas com a função de enviar as proteínas para degradação através do complexo proteassomal, as E3-ligases da categoria HECTs regulam o tráfego de receptores, canais transportadores e proteínas virais. Apesar de pesquisas demonstrarem que essa superfamília está envolvida na regulação de processos fisiológicos e patologias (câncer, doenças neurológicas e distúrbios imunológicos), os mecanismos funcionais de algumas dessas enzimas ainda requerem mais estudos (Rotin & Kumar, 2009; Weber et al., 2019).

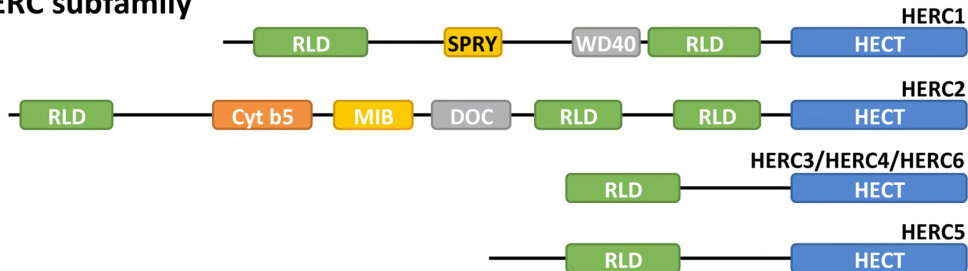


**Figura 2. Processo de ubiquitinação.** A ubiquitina (Ub) é ativada pela enzima de ativação de ubiquitina (E1; etapa 1) e transferida para uma enzima de conjugação de ubiquitina (E2; etapa 2). E2 e o substrato se ligam especificamente a uma determinada ubiquitina-proteína ligase (E3) e a porção da ubiquitina ativada é então transferida para o substrato da proteína (etapa 3). A conjugação sucessiva de porções de ubiquitina formam uma cadeia de poliubiquitinação que funciona como um sinal para direcionar o substrato para degradação via proteassoma 26S (etapa 4). O substrato é degradado em peptídeos (etapa 5) e a Ub é liberada para o citosol pela ação de enzimas desubiquitilantes (DUBs; etapa 6). P<sub>i</sub>, fosfato inorgânico; PP<sub>i</sub>, pirofosfato. Adaptado de Welchman., 2005, Nature.

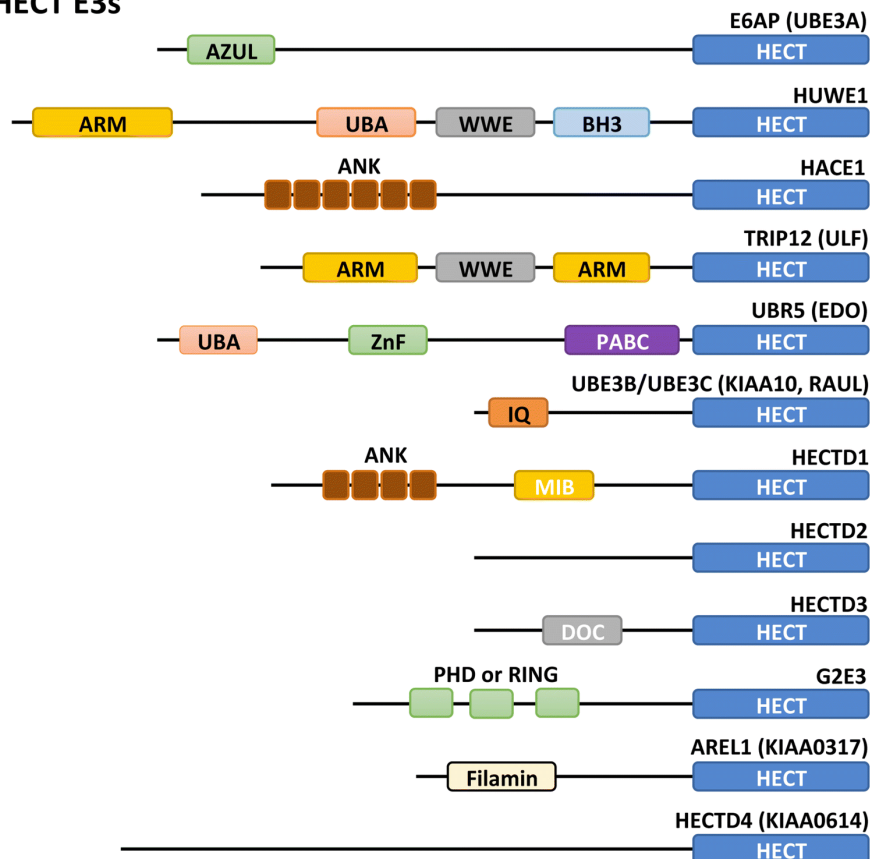
### NEDD4 subfamily



### HERC subfamily



### "Other" HECT E3s



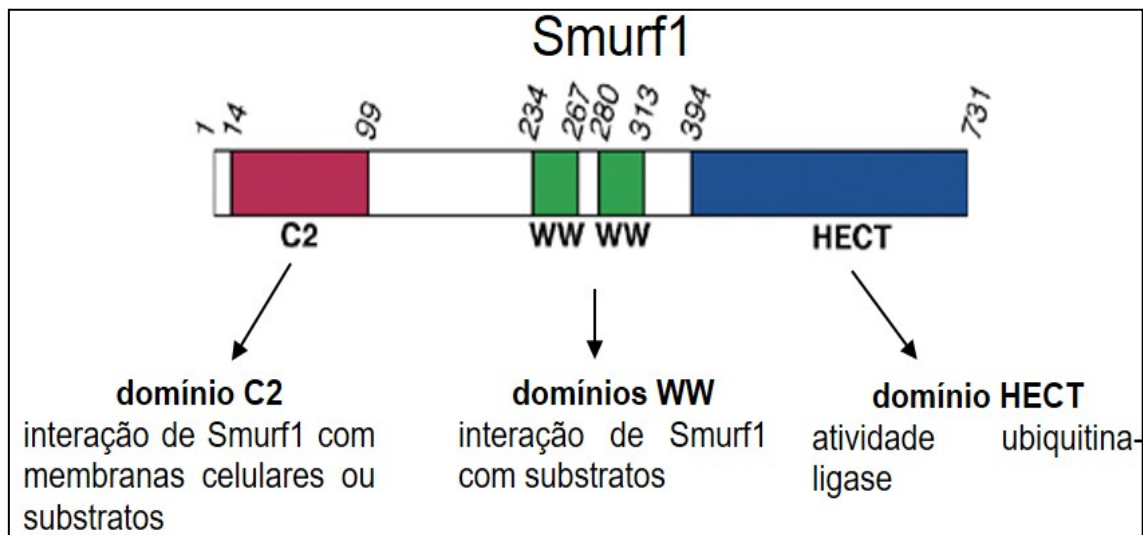
**Figura 3. E3 Ligases do domínio HECT.** Existem 28 tipos de HECT humanas que são divididas em 3 famílias: NEDD4, HERC e outras HECT. Essas famílias apresentam domínios semelhantes entre si, com exceção da família outras HECT. Os membros da família NEDD4 são caracterizados pela presença dos domínios WW e C2. A família HERC têm em comum o domínio RLD. As outras ligases possuem domínios distintos. Adaptado de Sluimer., 2018 Cellular and Molecular Life Sciences.

A Ub é composta por sete resíduos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63) que são responsáveis em formar as cadeias de poliubiquitina. Os substratos podem ser ubiquitinados com a adição de uma única cadeia de Ub (monoubiquitinação) ou várias cadeias de Ub (poliubiquitinação) ao substrato. Os vários tipos de cadeias que podem ser formadas entre a Ub e o substrato estão associados a diferentes funções celulares, sendo as cadeias de poliubiquitina ligadas a K48 e K63 os tipos mais abundantes. As cadeias K48 direcionam os substratos para degradação via proteassoma, enquanto as cadeias K63 direcionam os substratos para sinalização e controle de respostas imunes (Mallette & Richard, 2012; Ohtake et al., 2016). As funções das demais ligações que podem ser formadas pela Ub são alvos de estudos para melhor compreensão de como essas cadeias de Ub regulam os processos celulares (Akutsu et al., 2016).

### **1.5. E3 UB-Ligase SMURF1 na Regulação da Resposta imune e Resistência à Infecções**

Smurf1 (*smad ubiquitylation regulatory factor-1*) é uma E3 ubiquitina-ligase pertencente à família NEDD4 do grupo das HECTs (Zhu et al., 1999). Smurf1 surgiu no início da evolução dos metazoários e é expresso em todos os estágios de desenvolvimento, desde o embrião ao adulto e em muitos órgãos (ossos, cartilagem, coração, pulmão, sistema nervoso e órgãos genitais) (Cao & Zhang, 2013a). Estruturalmente, Smurf1 contém um domínio catalítico C-terminal denominado HECT, dois domínios WW e um domínio C2 N-terminal (Figura 4). O domínio HECT é responsável pela atividade catalítica de Smurf1 e a mutação pela troca do resíduo de cisteína na posição 699 por um resíduo de alanina (C699A) demonstrou que houve inativação de sua atividade ubiquitina-ligase (Cheng et al., 2011; M. Wang et al., 2014; Yuan et al., 2012). Os domínios WW promovem a ligação de Smurf1 com seu substrato e o domínio C2 é importante para mediar a interação de Smurf1 com membranas celulares ou com substratos (Fei et al., 2014; K. Lu et al., 2011).

Desde sua descoberta Smurf1 tem sido associado a vários processos biológicos importantes. Suas funções foram inicialmente descritas como a capacidade de ubiquitinar SMAD1 e SMAD5 durante o processo de sinalização celular de BMPs (*bone morphogenetic proteins*) (Cao & Zhang, 2013a; Ying et al., 2003; Zhu et al., 1999).



**Figura 4: Estrutura molecular de Smurf1.** Representação esquemática dos três domínios estruturais de Smurf1 humano. Os números representam a posição e o intervalo dos resíduos de aminoácidos que compõem cada domínio. C2: N-terminal; HECT: C-terminal.

Smurf1 promove a homeostasia óssea através da ubiquitinação e degradação de Runx2 (Kaneki et al., 2006; Yamashita et al., 2005; Zhao et al., 2003) e modula a motilidade e crescimento celular através da degradação da GTPase RhoA (Narimatsu et al., 2009; Ozdamar et al., 2005; H. R. Wang et al., 2003). Smurf1 foi identificado também como um oncogene em cânceres humanos (Ke et al., 2017; Kwon et al., 2013).

Evidências experimentais sugerem que Smurf1 pode atuar na regulação da resposta imune direcionando para degradação proteassomal proteínas importantes na sinalização do sistema imune através de um mecanismo dependente de ubiquitinação do tipo K48. Análises bioquímicas em células HEK (*human embryonic kidney*) superexpressando Smurf1 demonstraram que Smurf1 interagiu fisicamente com STAT1

(fator de transcrição ativado em resposta ao IFN- $\gamma$ ) induzindo sua ubiquitinação e degradação (Yuan et al., 2012). Em outros modelos utilizando células HEK, Smurf1 interagiu fisicamente com MAVS (proteína adaptadora da via de sinalização de RIG-I), com MEKK2 (MAPK importante na sinalização de TLR9) ou com T $\beta$ RI (uma das subunidades do receptor de TGF- $\beta$ ), induzindo a ubiquitinação e degradação proteassomal destes substratos (Ebisawa et al., 2001; Y. Wang et al., 2012; Wen et al., 2015). Esses dados sugerem que Smurf1 regula negativamente a sinalização de IFN- $\gamma$ , RIG-I, TLR9 e TGF- $\beta$ . Outro estudo demonstrou também que um dos mecanismos inibitórios da sinalização de TLR4 mediado por TGF- $\beta$  é dependente da ubiquitinação e degradação proteassomal de MyD88 mediada por Smurf1 (Lee et al., 2011).

Também foi demonstrado que Smurf1 tem um papel importante na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas pela modulação do processo de autofagia. A autofagia é um processo de degradação celular altamente conservado, importante na resistência do hospedeiro contra infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), o agente causador da tuberculose humana (Gutierrez et al., 2004). Pesquisas recentes demonstraram que Smurf1 é essencial em promover a ubiquitinação de vacúolos contendo *M. tuberculosis* em macrófagos e direcioná-los para a via degradativa da autofagia (Franco et al., 2017). Nesse trabalho, macrófagos derivados da medula óssea de animais deficientes de Smurf1 (Smurf1<sup>-/-</sup>) apresentaram um defeito ao ubiquitinar vacúolos contendo não apenas *M. tuberculosis*, mas também *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), sugerindo que o papel de Smurf1 na ubiquitinação de bactérias intracelulares pode ser conservado entre diferentes espécies. Além disso, macrófagos derivados da medula óssea de animais Smurf1<sup>-/-</sup> apresentaram também um defeito no recrutamento da proteína autofágica LC3 (proteína essencial na formação do autofagossoma) para vacúolos contendo *M. tuberculosis* ou *L. monocytogenes*, indicando que Smurf1 é importante em mediar a autofagia antibacteriana dependente de ubiquitinação. Devido à falha na autofagia, macrófagos derivados da medula óssea de animais Smurf1<sup>-/-</sup> foram mais permissivos à replicação de *M. tuberculosis* ou *L. monocytogenes*. De acordo com esses resultados *in vitro*, animais Smurf1<sup>-/-</sup> apresentaram maior replicação bacteriana nos pulmões na fase crônica da infecção (120

dias após infecção) e menor sobrevivência comparados aos animais controle WT (*Wild-type*). De maneira geral esse trabalho demonstrou que Smurf1 funciona como um mediador da autofagia antibacteriana ao promover a ubiquitinação de vacúolos contendo bactérias.

Apesar de conhecermos parte dos mecanismos pelos quais Smurf1 participa na ativação da autofagia contra *M. tuberculosis*, ainda não sabemos qual o papel dessa ubiquitina-ligase na regulação da resposta imune durante infecções causadas por outras classes de bactérias ou seu papel na regulação da resposta imune. Além disso, nenhum dos estudos realizados anteriormente utilizaram um modelo experimental de infecção. Portanto, a função fisiológica de Smurf1 em regular a resistência contra infecções bacterianas ainda precisa ser mais bem compreendida.

Baseado nas informações que Smurf1 atua na degradação de substratos celulares relacionados à regulação da resposta imune, levantamos a hipótese que Smurf1 pode ser um fator importante na resistência do hospedeiro contra infecções bacterianas através da regulação da imunidade inata. Uma vez que não se sabe ainda qual o papel de Smurf1 em regular a resposta imune, o objetivo desse trabalho é estudar os papéis mediados por Smurf1 na sinalização de receptores da imunidade inata em macrófagos e na resistência do hospedeiro utilizando um modelo de infecção bacteriana. Esse trabalho nos permitirá um melhor entendimento do papel de Smurf1 no controle da resposta inflamatória e fornecerá bases para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias.

## 2. OBJETIVOS

---

### *Objetivo geral:*

Avaliar o papel de Smurf1 na sinalização da resposta imune inata e na resistência do hospedeiro contra infecções bacterianas.

### *Objetivos específicos:*

- Avaliar a participação de Smurf1 na produção de citocinas em macrófagos tratados com LPS (agonista de TLR4).
- Avaliar a participação de Smurf1 na ativação da via das ERK1/2 em macrófagos tratados com LPS (agonista de TLR4).
- Avaliar o papel de Smurf1 na resistência do hospedeiro contra infecção por *S. typhimurium*.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1. Animais

Animais C57BL/6 (wild-type; WT) ou deficientes de Smurf1 (Smurf1<sup>-/-</sup>), construídos no background genético C57BL/6 (Zhao et al., 2004), machos ou fêmeas de 6 a 8 semanas de idade foram mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, sob temperatura e ciclo claro-escuro controlados, com água filtrada e ração *ad libitum*. Os experimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 352/2018.

#### 3.2. Genotipagem dos Animais SMURF1<sup>-/-</sup>

Para a genotipagem das matrizes reprodutoras da colônia de animais Smurf1<sup>-/-</sup>, aproximadamente 0,3 cm do tecido da orelha dos animais foram coletados e incubados com 75 µL de Solução de Lise Alcalina (25 mM NaOH 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA2H<sub>2</sub>O pH 12) a 95° C por 60 minutos. Posteriormente, as amostras foram resfriadas a 4° C. Em seguida, foi adicionado 75 µL da Solução de Neutralização (1 mM Tris-Base) e centrifugado a 4.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes das amostras foram recolhidos e armazenados a 4° C até a realização do PCR.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 µL - 0,5 µL de amostra, 10 µL solução PCR MasterMix (Promega), 0,5 µL de cada primer (Forward e Reverse; 10 mM) acrescido de 8,5 µL de água Mili-Q autoclavada. As sequências dos primers utilizados estão indicadas abaixo (Tabela 2).

As reações foram incubadas no Termociclador Veriti 96Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), programado para 35 ciclos com tempo de duração aproximado de 1 hora e 50 minutos. Os ciclos compreenderam o seguinte programa: temperatura inicial de 95° C por 5 minutos, processo de desnaturação por 30 segundos a 94° C, hibridização 56° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 50 segundos. Foi utilizada

uma temperatura de 72° C para extensão final por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE1x acrescido de 1 µL de Brometo de etídeo. Para a obtenção das imagens dos géis utilizamos fotodocumentação Vilber Lourmat.

<b>PRIMER</b>	<b>SEQUÊNCIA</b>
Smurf1E7F	CAG TGT ATG AAG ACT CAG GC
Smurf1E7R	ATA GCC TTC AGG CAG CTC TG
Smurf1 KO 67440	TGC ACC AGT GAG ACT AGA AC
Smurf1 KO NeoR	CCA GAC TGC CTT GGG AAA AGC

**Tabela 2. Sequência de primers para genotipagem de Smurf1.**

Como referência para identificarmos o tamanho das bandas, nas canaletas 1 e 15 do gel de agarose, utilizamos uma solução padrão de referência que contém fragmentos de DNA - Marcador Molecular 1 kb Plus (INVITROGEN) - e na canaleta 2 uma solução sem a presença de DNA (BRANCO) como controle.

### **3.3. Obtenção de Macrófagos e Tratamento com LPS**

Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) foram obtidos por eutanásia dos animais WT e Smurf1<sup>-/-</sup>, retirando os fêmures e tíbias (Franco et al., 2017). As extremidades proximal e distal desses ossos foram cortadas e neles foi realizada uma lavagem com meio DMEM (GIBCO; USA) para retirada das células-tronco. As células foram recolhidas em tubos e em seguida, distribuídas em placas de cultura celular acrescidas do meio DMEM enriquecido com 10% de soro bovino fetal (FBS) (GIBCO; BRASIL) e 20% de meio de diferenciação LCCM (meio condicionado de células L929). As células foram mantidas em estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e no terceiro dia foram adicionados mais 15 mL do meio de diferenciação. No sétimo dia os macrófagos foram desprendidos das placas de cultura para início dos experimentos. Esse procedimento consistiu em retirar todo o meio de cultura e lavar as placas com 10

mL de PBS 1X para retirada das células mortas ou que não se diferenciaram. Em seguida, foi acrescentado 5 mL de PBS 1X e posicionado o fundo das placas em gelo por 5 minutos. Posteriormente, as placas foram deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos e adicionados 200 µL da solução de EDTA 0,5 M pH 8 para auxiliar na retirada das células. Imediatamente após adição da solução de EDTA, iniciou-se o processo de lavagem da placa com pipeta automática em toda a extensão para retirada dos BMDM. As células foram recolhidas em tubo Falcon 50 mL e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos. O pellet obtido foi ressuscitado em 5 mL de meio de manutenção (meio DMEM + 10 % FBS + 5 % LCCM) e efetuado a contagem das células em câmara de Neubauer. Para realização do experimento, um total de  $3 \times 10^5$  células foram plaqueadas em cada poço, de uma placa de 24 poços (GREINER BIO-ONE; BRASIL), no volume final de 200 µL por poço. Em seguida, as placas foram incubadas por um período de 24 horas a 37° C em estufa bacteriológica sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> antes de serem tratadas com LPS.

Após 24 horas os BMDM foram lavados delicadamente, por duas vezes, utilizando PBS 1X e tratados com LPS de *S. typhimurium* (SIGMA; USA) após sonicação por 5 minutos. As concentrações utilizadas de LPS foram 25 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL. Os sobrenadantes dos macrófagos tratados foram coletados após 7 horas e armazenados a -80° C para a análise da produção de citocinas pelo método de ELISA.

### **3.4. Dosagem das Citocinas**

As dosagens das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 foram realizadas no sobrenadante das culturas de macrófagos pelo método de ELISA utilizando o kit Duoset (R&D SYSTEMS; USA) seguindo as recomendações do fabricante. Os limites de detecção foram: 31,25 ng/mL a 2.000 ng/mL para ambas as citocinas.

### 3.5. Western Blot

BMDM de animais WT ou *Smurf1*<sup>-/-</sup> foram cultivados e tratados com LPS (100 ng/ml) por 20, 40 e 60 minutos. Após esses períodos, os lisados celulares foram coletados e submetidos a análises por western blot. Para isso, as culturas celulares foram lisadas com tampão de lise celular -80 µL RIPA (Lysis Buffer 10x; USA) + 720 µL H<sub>2</sub>O Mili-Q + 90 µL protease inibidor 10x. Durante todo o procedimento de lise as amostras e reagentes foram mantidas em gelo. Foi adicionado 60 µL do tampão de lise em cada poço contendo as culturas celulares e incubados por 10 minutos no gelo. Todo o volume obtido em cada poço foi coletado após homogeneização e centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos em ambiente refrigerado (4° C). Em seguida 50 µL de cada amostra foi retirado e adicionado 25 µL do tampão de amostra (BIORAD; USA). Posteriormente, o volume final foi recolhido e colocado a 97° C por 5 minutos.

Em seguida, as proteínas foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% e posteriormente, transferidas para membrana de PVDF (BIORAD; USA). As membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 20 contendo 5% de leite desnatado (tampão de bloqueio) por 1 hora sob agitação, em temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários diluídos em tampão de bloqueio: anti-ERK1/2 (1:1000; Cell Signaling; USA), anti-pERK1/2 (1:1000; Cell Signaling; USA) ou anti-β-actina-HRP (1:1000; Santa Cruz; USA). Os anticorpos primários foram incubados overnight a 4° C sob agitação. No dia seguinte as membranas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS-Tween 20) e incubadas com os respectivos anticorpos secundários marcados com HRP (exceção da β-actina) diluídos em tampão de bloqueio (1:2000) por 1 hora. Após três lavagens com tampão de lavagem, as membranas foram incubadas com o revelador Kodak (CARESTREAM DENTAL; USA) por 3 minutos e as imagens dos géis foram obtidas com o uso de filmes de raio-x.

### 3.6. Infecção de Animais com *S. typhimurium*

Salmonella entérica serovar *Typhimurium* (ATCC 14028) foi gentilmente cedida pelo Prof. Flaviano dos Santos Martins (Departamento de Microbiologia, ICB-UFMG). O cultivo das bactérias foi feito em meio LB sob agitação a 37° C overnight. Após este período, um novo cultivo foi preparado em meio LB com 2% da suspensão bacteriana inicial e mantido sob agitação por 3 horas a 37° C. Após esse período, a cultura foi lavada duas vezes com PBS e ressuspendida em PBS estéril. Posteriormente, a concentração de bactérias na suspensão foi determinada pela leitura da densidade óptica a 670 nm, sendo a O.D. de 0,02 correspondente a  $2,5 \times 10^7$  bactérias/mL, conforme técnica previamente padronizada pelo nosso grupo.

Para o experimento de análise da sobrevida e do escore clínico, os animais foram injetados na cavidade peritoneal com 200 µL de uma suspensão bacteriana contendo  $1 \times 10^2$  bactérias/ml. Para os demais experimentos (análise sanguínea, replicação bacteriana em órgãos afetados e histopatologia), os animais foram infectados pela injeção de  $1 \times 10^4$  bactérias/mL na cavidade peritoneal.

### 3.7. Escore Clínico e Análise de Sobrevida

Animais WT ou *Smurf1*<sup>-/-</sup> infectados com *S. typhimurium* foram avaliados quanto à sobrevida e parâmetros clínicos relacionados com a progressão da infecção (modelo adaptado de Shrum et al., 2014). Durante o acompanhamento da sobrevivência dos animais, aqueles que apresentaram perda de massa corpórea superior a 20 % do peso inicial foram eutanasiados. As observações clínicas do estado do animal durante o experimento ocorreram a cada 24 horas e foram analisados os seguintes parâmetros clínicos: atividade, postura, pelo, respiração, alterações oculares e edema de face. As alterações clínicas observadas foram pontuadas em escala de 0 (sem alterações) a 4 (alterações severas) conforme descrito abaixo:

#### **Atividade:**

0: animal se movimenta normalmente;

- 1: animal se movimenta sozinho, porém de forma mais lenta e/ou por alguns períodos;
- 2: animal se movimenta sozinho, porém ainda mais lento e/ou faz longas pausas;
- 3: animal praticamente não sai do lugar, mesmo com estímulo;
- 4: sem atividade e o animal pode apresentar tremores.

**Postura:**

- 0: postura normal;
- 1: animal começa a apresentar um leve encurvamento de tronco (corcunda) que não se desfaz totalmente quando você o estica;
- 2: animal apresenta o encurvamento acentuado, porém ainda estica um pouco;
- 3: animal com bastante encurvamento de tronco e se desfaz um pouco apenas;
- 4: animal com bastante encurvamento de tronco.

**Pelo:**

- 0: pelo normal;
- 1: pelos piloerectados;
- 2: maioria da costa é piloerectado;
- 3: a piloereção pode ou não está presente (animal inchado);
- 4: a piloereção está presente (animal magro).

**Respiração:**

- 0: respiração normal;
- 1: breves períodos de respiração difícil;
- 2: respiração difícil, mas sem ofegar;
- 3: respiração difícil e ofegante;
- 4: ofegante.

**Alterações nos olhos:**

- 0: olhos aberto e ausência de secreção;
- 1: olhos não totalmente abertos, possível secreção;
- 2: olhos pelo menos meio fechado, possivelmente com secreção;

3: olhos meio fechados ou mais, possivelmente com secreção;

4: olhos fechados ou leitosos.

#### **Edema de face:**

0: ausência de alteração na face;

1: leve aumento da região entre os olhos;

2: moderado aumento na região entre os olhos;

3: severo aumento da região entre os olhos.

A partir desse monitoramento foram feitos os registros de mortalidade diária e posteriormente calculado o percentual de sobrevivência dos animais (adaptado de S. Qureshi et al., 2001). As observações dos parâmetros clínicos foram compiladas por animal, ao final os valores foram somados e, em seguida, realizadas as análises estatísticas.

### **3.8. Análise de Parâmetros Sanguíneos dos Animais Infectados**

Animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> foram infectados com *S. typhimurium* conforme descrito acima. Quarenta e oito horas após a infecção, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado e analisado em Hemocítômetro (Nihon Khoden; Celtac) para a contagem diferencial de linfócitos, monócitos, eosinófilos, granulócitos, células totais ou plaquetas.

### **3.9. Ensaio de Replicação Bacteriana no Fígado e Baço de Animais Infectados**

Animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> foram infectados com *S. typhimurium* conforme descrito no item 3.6. Quarenta e oito horas após a infecção, fragmentos do fígado e baço foram coletados e submetidos ao ensaio de replicação bacteriana. Para isso, fígado e baço foram coletados em 2 mL de PBS estéril, pesados e homogeneizados em sonicador Turrax para tecidos. Aliquotas dos lisados dos órgãos foram diluídas em série e plaqueadas em meio LB ágar. As placas foram incubadas a 37° C por 12 horas e o

número de CFU obtido foi contado. Os resultados foram expressos pelo número de CFU por mg de tecido.

### **3.10. Análise Histopatológica**

Fragmentos do fígado e pulmão de animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> infectados foram fixados em formaldeído tamponado 10% e após 48 horas foram transferidos para etanol 70%. Em seguida, foram realizadas as etapas do processamento histológico das amostras: fase alcoólica de desidratação (álcool 80%, 90%, 95% e 100%), fase de clarificação (xilol I e II), fase de impregnação (parafina I, II, III) e fase de inclusão da amostra em parafina. Posteriormente os materiais foram cortados a 5  $\mu$ m de espessura e corados com solução Hematoxilina & Eosina (H&E) para análise da estrutura tecidual.

As alterações observadas durante a análise dos tecidos foram compiladas em gráficos de barras, utilizando o programa Prisma. Para cada parâmetro analisado (presença de necrose, infiltrado inflamatório, degeneração tecidual e escore total) foram avaliados o grau de lesão (leve, moderada, intensa, severa) e agrupados em percentual para elaboração do gráfico.

### **3.11. Análises Estatísticas**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças estatísticas entre os resultados foram avaliadas através do teste de two-way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ou Teste  $t$  de Student, conforme indicado nos gráficos. As análises de sobrevida foram feitas pelo teste de Kaplan-meyer. As análises estatísticas foram conduzidas por meio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de  $p < 0,05$ .



## 4. Resultados

---

### 4.1. Genotipagem dos Animais SMURF1<sup>-/-</sup>

A colônia de animais Smurf1<sup>-/-</sup> foi estabelecida no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia em meados de 2019 e para certificar que as matrizes reprodutoras geradoras dos animais utilizados nesse estudo eram KO (*Knock out*) para a proteína Smurf1, foi realizada a genotipagem pela técnica de PCR utilizando conjuntos de primers que amplificam regiões específicas do gene e distinguem o material genético de animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup>. Para isso, os testes foram realizados com o material genético obtido de todas as matrizes de animais Smurf1<sup>-/-</sup> ou de um animal C57BL/6 (wild-type; WT) como controle.

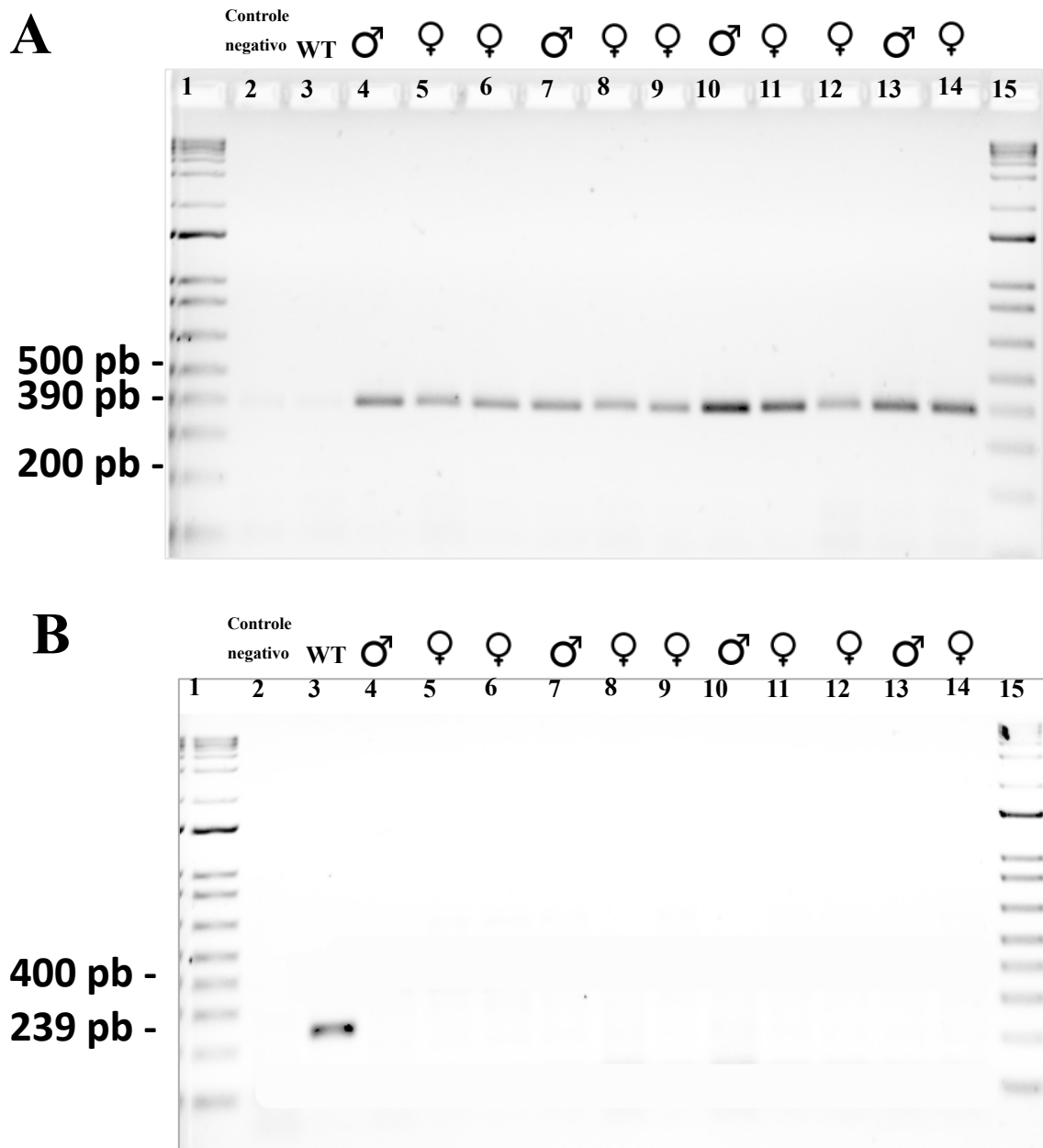
Foram utilizados conjuntos de primers distintos para identificação dos animais KO ou WT. As amostras dos animais KO foram aplicadas nas posições 4 a 14 das canaletas do gel de agarose e a amostra do animal WT foi aplicada na posição 3 da canaleta dos géis de agarose. Nesse experimento, utilizamos no gel A (Figura 5A) primers que amplificam as amostras dos animais KO e no gel B (Figura 5B) primers que amplificam a amostra WT.

As imagens obtidas a partir da eletroforese em gel de agarose mostraram a presença de uma banda bem definida com o tamanho de 390 pb condicente com o número de pares de bases esperado para os animais KO (Figura 5A) nas posições 4 a 14 das canaletas do gel de agarose. Na canaleta 3 não observamos a presença de bandas concordantes para o animal WT.

Como um modelo de contraprova, para garantir que as matrizes de camundongos Smurf1<sup>-/-</sup> eram KO, utilizamos um conjunto de primers que amplifica as amostras de camundongos C57BL/6 (WT). As imagens obtidas a partir da eletroforese do gel de agarose mostraram a presença de uma banda bem definida com o tamanho de 239 pb na canaleta 3 do gel de agarose, em acordo com o tamanho de pares de bases esperado para

o animal WT (Figura 5B). Nas demais posições do gel, nas canaletas de 4 a 14, não observamos a presença da banda de 239 pb que é o marcador exclusivo para os camundongos WT.

Esses resultados sugerem que todas as matrizes de camundongos *Smurf1*<sup>-/-</sup> eram *Knock out*, ou seja, os animais apresentaram a deleção do gene *Smurf1*.



**Figura 5. Genotipagem de animais *Smurf1*<sup>-/-</sup>.** O DNA total extraído das orelhas de animais WT ou *Smurf1*<sup>-/-</sup> foi submetido a PCR utilizando primers que amplificam e geram fragmentos de 390 pb (A) ou 239 pb (B) correspondentes a amostras de animais *Smurf1*<sup>-/-</sup> ou WT, respectivamente. As canaletas 4-14 apresentam amostras das matrizes *Smurf1*<sup>-/-</sup>, a canaleta 3 apresenta amostra de um animal WT (controle) e a canaleta 2 corresponde ao controle negativo da reação de PCR (água).

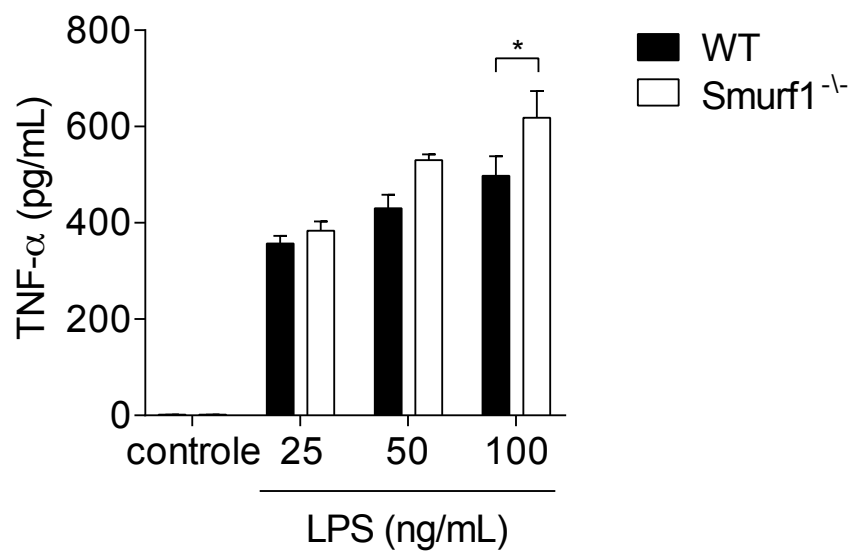
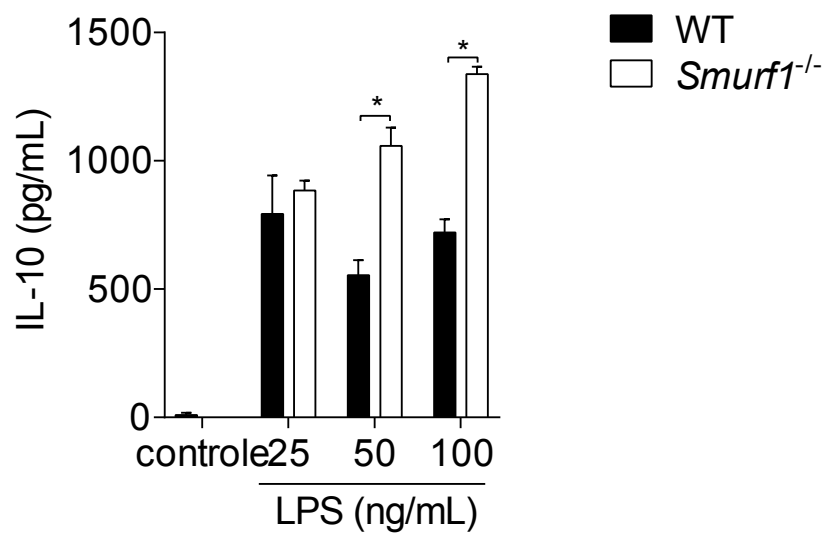
#### 4.2. Dosagem de citocinas no Sobrenadante de Macrófagos Tratados com LPS

Trabalhando com a hipótese de que a proteína Smurf1 participa da regulação da sinalização da resposta imune inata, iniciamos nossos estudos utilizando como modelo experimental o estímulo de macrófagos com LPS, uma agonista de TLR4, seguido da dosagem de citocinas no sobrenadante.

BMDM obtidos de animais WT e Smurf1<sup>-/-</sup> foram tratados com LPS nas doses de 25 ng/ml, 50 ng/ml ou 100 ng/ml e os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados após 7 horas do tratamento. A produção das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-10 foram quantificadas por ELISA.

Analisando os resultados, observamos que BMDM de animais Smurf1<sup>-/-</sup> produziram níveis significativamente mais elevados da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  na concentração de 100 ng/mL de LPS em relação aos macrófagos de animais WT tratados com o mesmo estímulo (Figura 6A). Além disso, observamos maior produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por Smurf1<sup>-/-</sup> em comparação às células dos animais WT (Figura 6B) após tratamento com diferentes doses de LPS, com aumento significativo na concentração de 100 ng/ml de LPS.

Portanto, nossos dados sugerem que Smurf1 pode controlar a produção de citocinas dependente da via de TLR4 em macrófagos.

**A****B**

**Figura 6. Dosagem de TNF- $\alpha$  e IL-10 no sobrenadante de macrófagos tratados com LPS.** BMDM de animais WT ou *Smurf1*<sup>-/-</sup> foram tratados com LPS nas doses indicadas na figura. Sete horas após estimulação, o sobrenadante foi coletado e a concentração de TNF- $\alpha$  (A) e IL-10 (B) foi determinada por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da concentração de citocinas obtidas de triplicatas experimentais. \*  $p < 0,05$ ; teste two-way ANOVA.

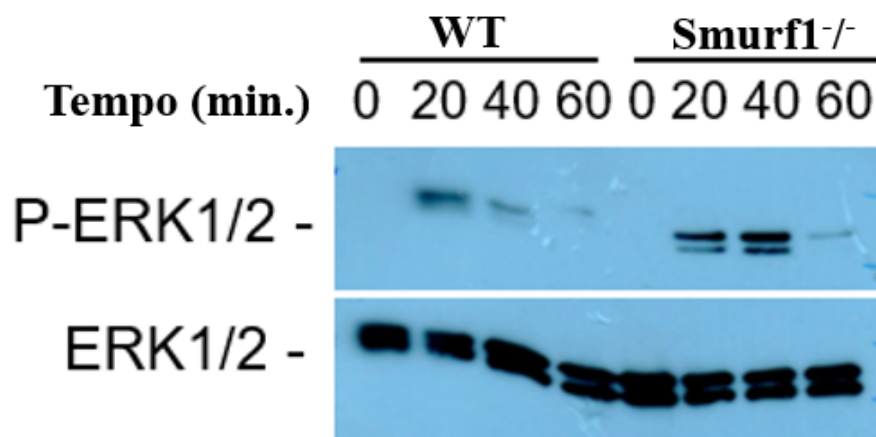
### 4.3. Avaliação da Ativação da Via ERK1/2 em Macrófagos Tratados com LPS

Baseado em nossos dados que sugerem que Smurf1 exerce um papel de controle na produção de citocinas em macrófagos, avaliamos posteriormente se a regulação da ativação de TLR4 por Smurf1 ocorreria através da via de ERK1/2 (proteína-quinase da via das MAPK importante na produção de citocinas).

Para isso, BMDM de animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> foram estimulados com 100 ng/mL de LPS e os níveis de fosforilação de ERK1/2 foram determinados por immunoblotting nos lisados celulares após 20, 40 e 60 minutos de tratamento (Figura 7).

Analisando os resultados obtidos, observamos que o tratamento com LPS estimulou a fosforilação de ERK1/2 em macrófagos WT, sendo que o pico da fosforilação ocorreu aos 20 minutos e reduziu progressivamente no decorrer dos 60 minutos pós-tratamento. Em relação aos BMDM de animais Smurf1<sup>-/-</sup>, observamos que a fosforilação de ERK1/2 foi semelhante àquela observada nos BMDM dos animais WT, sendo que o pico da fosforilação ocorreu aos 40 minutos após o tratamento com LPS. A análise comparativa da densidade das bandas obtidas de p-ERK1/2 em comparação com os níveis totais de ERK1/2 intracelulares, revelou que a fosforilação de ERK1/2 observada em BMDM dos animais Smurf1<sup>-/-</sup> tratados com LPS foram maiores em relação ao que observamos nos BMDM dos animais WT tratados dentro do mesmo período de tempo.

Por isso, esse dado sugere que Smurf1 exerce um papel de regulador negativo da fosforilação de ERK1/2 em macrófagos.



**Figura 7. Análise da ativação de ERK1/2 em macrófagos tratados com LPS.** BMDM de animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> foram tratados com 100 ng/ml de LPS e os níveis de fosforilação de ERK1/2 foram determinados por imunoblotting nos lisados celulares após 20, 40 e 60 minutos de tratamento. Os níveis de ERK1/2 totais (não fosforilados) foi semelhante em todos os grupos estudados.

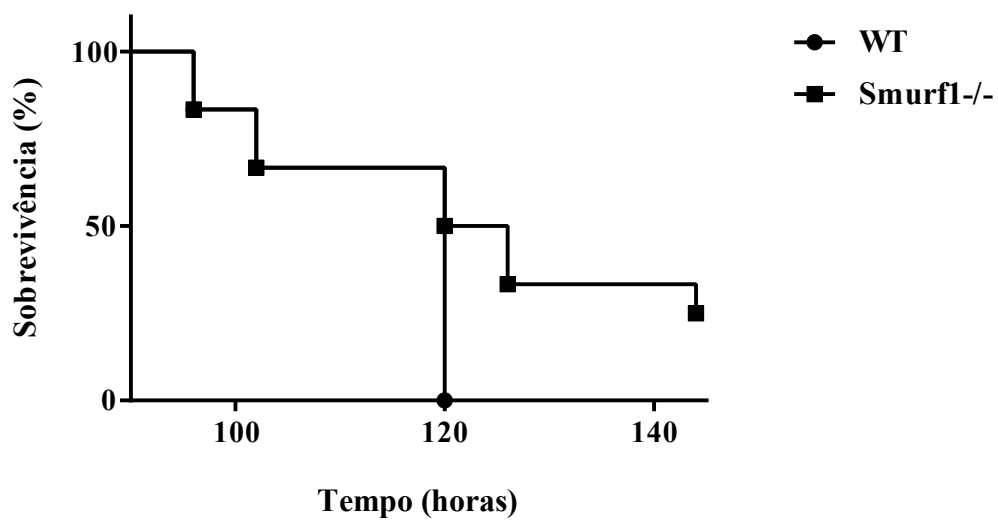
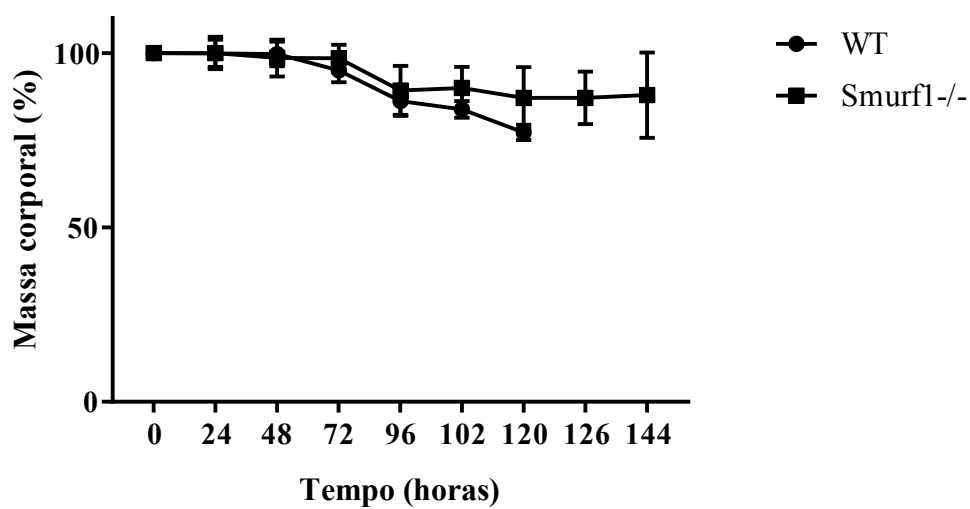
#### 4.4. Análise do Escore Clínico e Sobrevida dos Animais Infectados

Os resultados obtidos até o momento sugerem que Smurf1 possivelmente exerce uma função importante na regulação da sinalização de TLR4 em macrófagos. Portanto, levantamos a hipótese de que Smurf1 funcionaria como um fator essencial na regulação da imunidade inata e resistência a infecções *in vivo*. Animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> foram infectados pela via intraperitoneal com  $1 \times 10^2$  CFU da bactéria *S. typhimurium* e submetidos à análise de parâmetros clínicos importantes durante a instalação do processo infeccioso.

Os parâmetros clínicos analisados foram a atividade do animal, postura, respiração, pelo, alterações oculares e edema de face. As observações clínicas ocorreram a cada 24 horas, e, para cada evento, foi dado uma nota de 0 a 4, conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS. Além dos dados clínicos, a sobrevida dos animais infectados também foi avaliada. Os animais foram sacrificados quando perderam 20% do peso inicial.

Quando avaliamos as alterações clínicas geradas pelo processo infeccioso não observamos alterações significativas no escore clínico entre os animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> (Figuras 9A). Para melhor compreensão dos dados obtidos quanto aos parâmetros avaliados ao longo do experimento, os resultados foram compilados em gráfico mapa de calor apresentando os escores clínicos observados a cada 24 horas (Figura 9B). Ao analisarmos o mapa observamos que a partir de 96 horas após a infecção os animais WT apresentaram uma piora progressiva no quadro clínico e na perda de peso, sendo que eles foram sacrificados em 120 horas após a infecção. Por outro lado, os animais Smurf1<sup>-/-</sup> apresentaram um pico de piora em seu quadro clínico em 102 horas após infecção, mas ainda assim apresentavam peso suficiente para continuarmos os experimentos. Em 144 horas após infecção o experimento com os animais Smurf1<sup>-/-</sup> foi encerrado devido ao comprometimento grave dos animais Smurf1<sup>-/-</sup>.

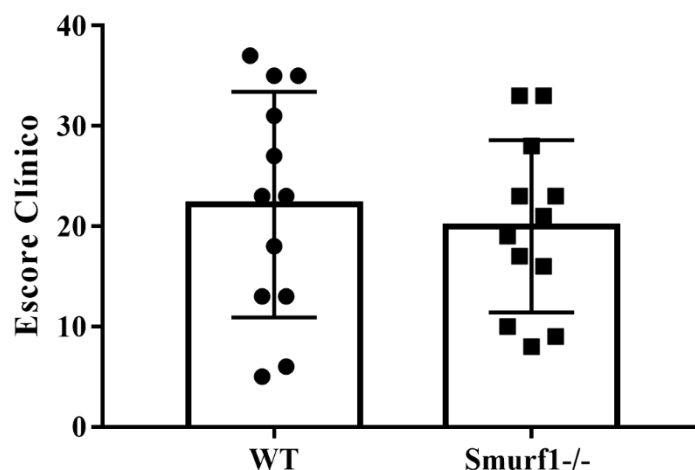
Observamos que os animais WT apresentaram sobrevida semelhante aos animais Smurf1<sup>-/-</sup> (Figura 8A) e a perda de massa corporal entre os dois fenótipos também foi similar ao longo do experimento (Figura 8B). Apesar de não termos identificado diferenças estatísticas entre os dois fenótipos, percebemos que os animais Smurf1<sup>-/-</sup> que sobreviveram por um período de tempo mais prolongado em relação aos animais WT, apresentaram parâmetros clínicos mais comprometidos e graves, e foram sacrificados, apesar de não terem perdido 20% do seu peso corporal.

**A****B**

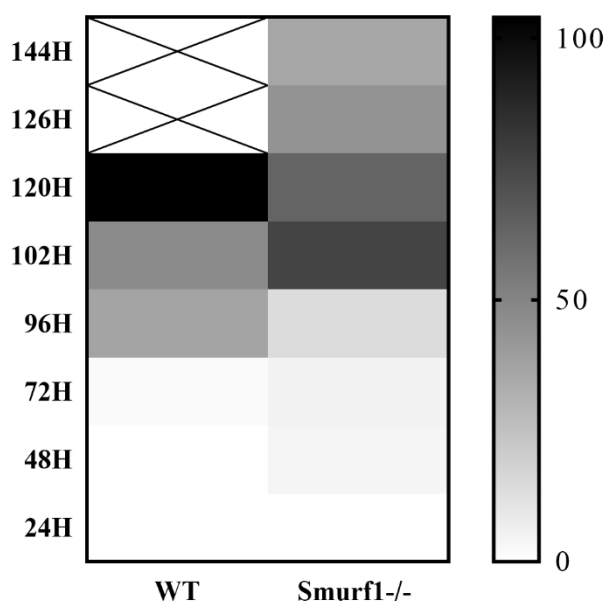
**Figura 8. Análise da sobrevivência e massa corporal dos animais infectados com *S. typhimurium*.** Animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> foram infectados via intraperitoneal com  $1 \times 10^2$  CFU da bactéria *S. typhimurium* e a sobrevivência (A) e o peso corporal (B) foram acompanhados por 144 horas após infecção.



A



B



**Figura 9. Escore clínico dos animais infectados com *S. typhimurium*.** Animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> foram infectados via intraperitoneal com  $1 \times 10^2$  CFU da bactéria *S. typhimurium* e submetidos à avaliação das condições clínicas durante o processo infeccioso. As figuras apresentam o escore clínico geral (soma de todos os parâmetros analisados) (A) e o mapa de calor dos escores clínicos dos parâmetros analisados na figura A e compilados a cada 24 horas (B). As cores indicam a gravidade dos parâmetros analisados que variam entre 0 (condições clínicas normais) e 100 (condições clínicas severas). Os pontos apresentados na figura A representam os valores individuais de escore clínico total de cada animal. As barras representam a média  $\pm$  DP dos valores individuais obtidos.

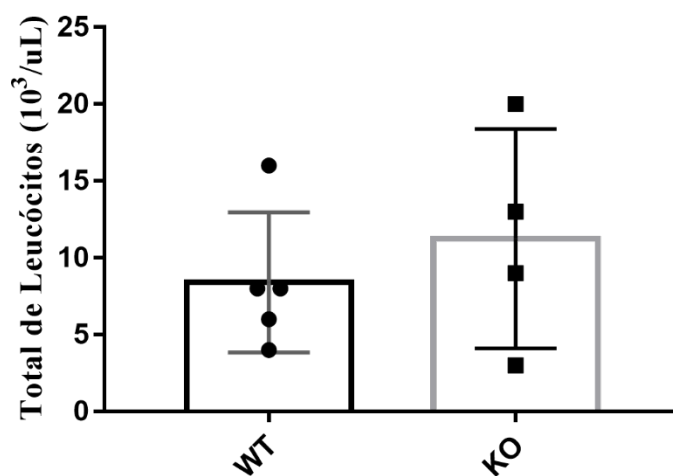
#### 4.5. Contagem de Leucócitos na Circulação de Animais Infectados

Dando sequência em nossos estudos, animais WT ou *Smurf1*<sup>-/-</sup> foram infectados pela via intraperitoneal com  $1 \times 10^4$  CFU da bactéria *S. typhimurium* e fatores relacionados à progressão da doença foram avaliados 48 horas após a infecção.

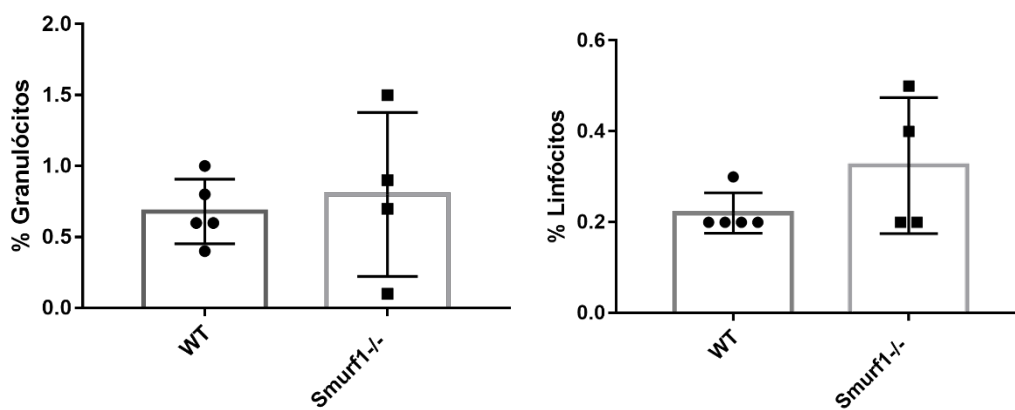
Primeiramente, avaliamos a contagem diferencial de leucócitos circulantes com o uso de Hemocitômetro. A análise hematológica mostrou que não há diferença estatística no número absoluto de leucócitos na circulação sanguínea entre os dois fenótipos (Figura 10A). Ao realizarmos a análise do percentual dos diferentes tipos de leucócitos (granulócitos e linfócitos) não observamos diferença na contagem celular entre os animais WT e *Smurf1*<sup>-/-</sup> (Figura 10B).

Por motivo desconhecido monócitos, eosinófilos e plaquetas não foram quantificados pelo aparelho.

A



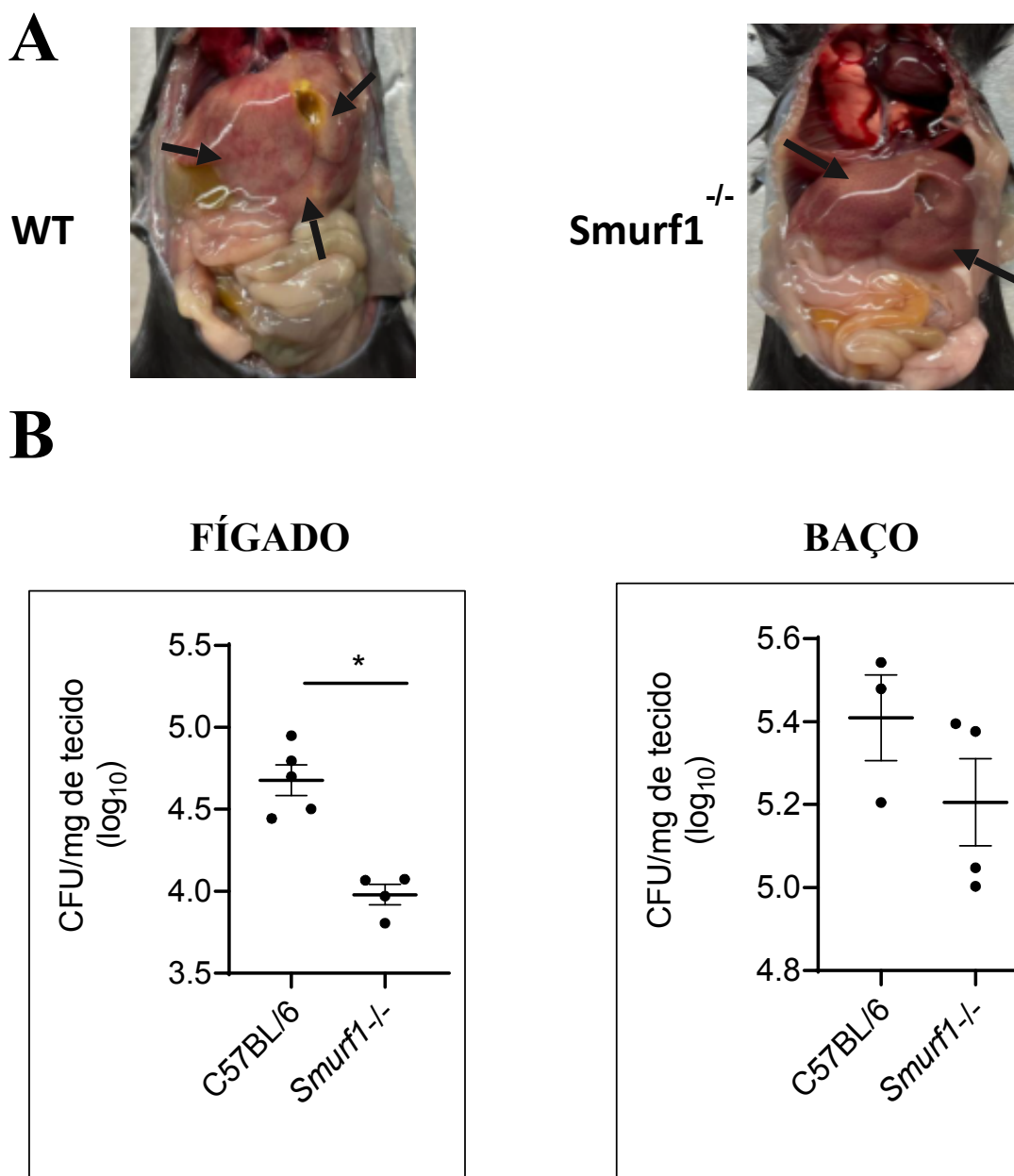
B



**Figura 10. Contagem diferencial do número de células circulantes no sangue dos animais infectados com *S. typhimurium*.** Animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> foram infectados via intraperitoneal com 1x10<sup>4</sup> CFU da bactéria *S. typhimurium* e foi realizada a contagem das células circulantes após 48 horas. (A) Contagem global do número de leucócitos. (B) Contagem diferencial do número de granulócitos e linfócitos. As barras representam a média ± DP dos parâmetros analisados. Os pontos representam os valores individuais contados em cada animal.

#### **4.6. Replicação Bacteriana no Fígado e Baço de Animais Infectados**

Além da contagem de leucócitos sanguíneos, determinamos também a replicação bacteriana no fígado e baço dos animais 48 horas após a infecção. Observamos macroscopicamente, no momento da eutanásia, a presença de hepatomegalia acentuada e maior número de abscessos hepáticos em animais WT comparados aos animais *Smurf1<sup>-/-</sup>* (Figura 11A). De maneira interessante, o fígado de animais WT apresentaram números significativamente maiores de bactérias replicativas quando comparados aos de animais *Smurf1<sup>-/-</sup>*. Porém, não encontramos diferenças significativas no número de bactérias replicativas no baço dos animais (Figura 11B).



**Figura 11. Análise da replicação bacteriana no fígado e baço dos animais infectados com *S. typhimurium*.** Animais WT ou *Smurf1*<sup>-/-</sup> foram infectados via intraperitoneal com  $1 \times 10^4$  CFU da bactéria *S. typhimurium* e a contagem do número de bactérias replicativas no fígado e baço dos animais foi realizada 48 horas após infecção. (A) Imagem macroscópica dos órgãos dos animais WT ou *Smurf1*<sup>-/-</sup> no momento da eutanásia. As setas indicam pontos de abscessos e hepatomegalia. (B) Contagem do número de bactérias replicativas no fígado e baço dos animais infectados. Os dados são representados como a média  $\pm$  DP do número de CFU encontrado nos tecidos. Os pontos representam os valores individuais de cada animal. \*  $p < 0,05$ ; teste t de Student.

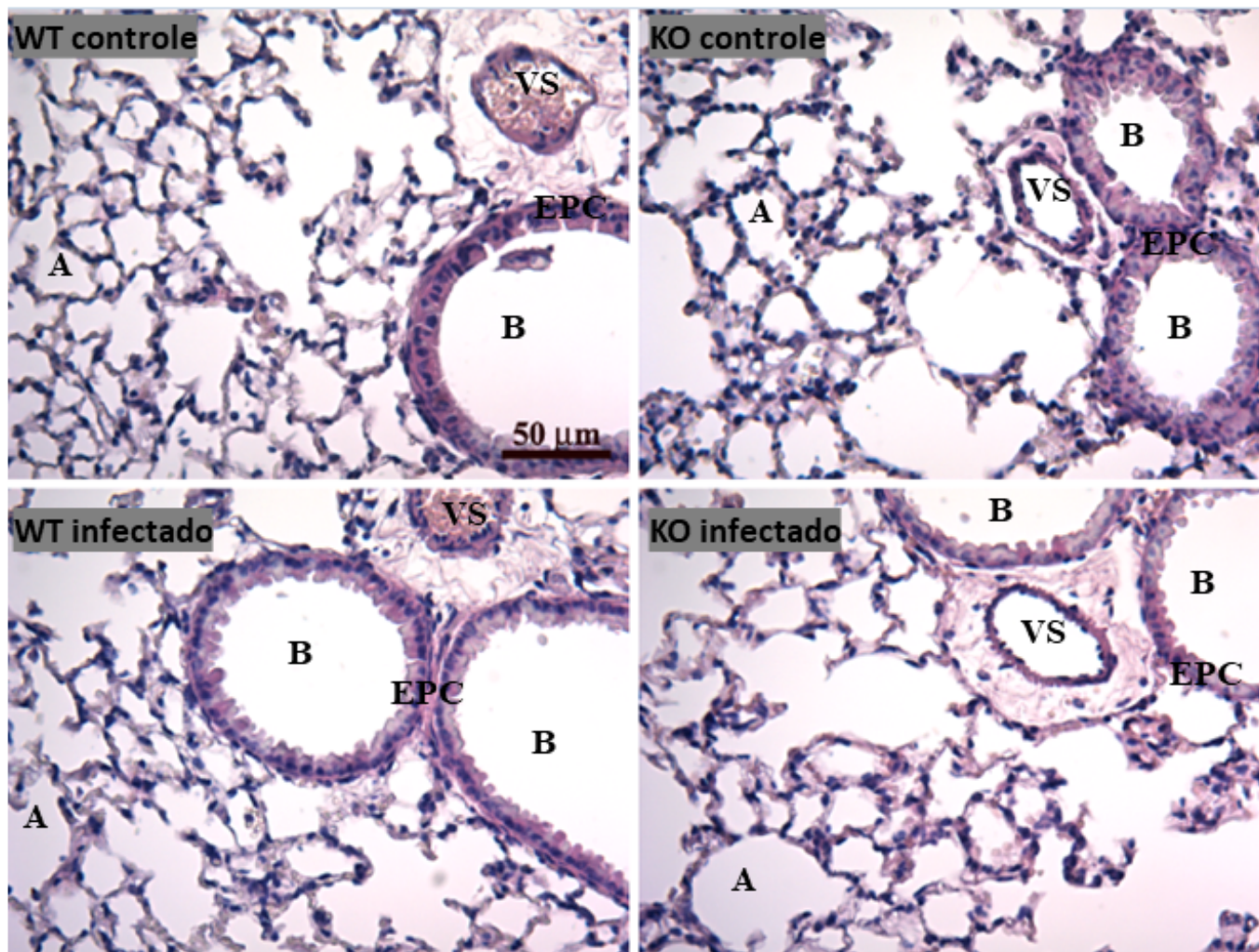
#### 4.7. Análise Histopatológica do Pulmão e Fígado dos Animais Infectados

A seguir, realizamos a análise histopatológica do pulmão e fígado dos animais infectados com *S. typhimurium*. A literatura descreve a presença de intenso infiltrado inflamatório em ambos os órgãos de animais submetidos à infecção sistêmica semelhante a que promovemos nos animais WT e Smurf1<sup>-/-</sup> (Horvat et al., 2007; Mathur et al., 2012).

A análise histopatológica do pulmão dos animais infectados com *S. typhimurium* não apresentou nenhuma alteração significativa ou infiltração de leucócitos entre os animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> infectados, comparados aos respectivos grupos controle (animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> não infectados) (Figura 12).

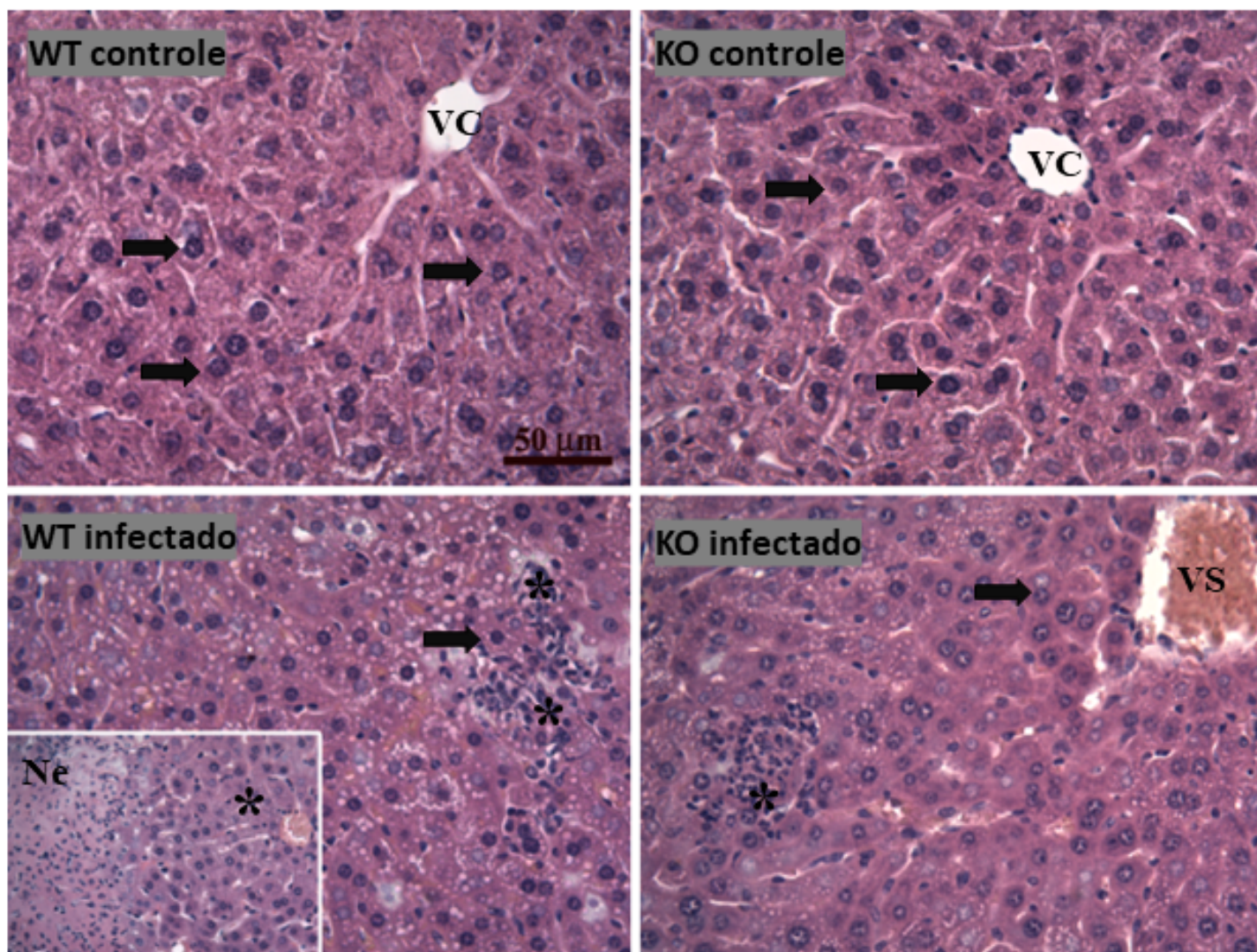
Quando visualizada a análise histopatológica do fígado, observamos diferenças entre os animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> em relação aos grupos controle (não infectado) e entre os dois fenótipos infectados. Os animais do grupo controle não apresentaram lesão tecidual. Os animais WT infectados com *S. typhimurium* apresentaram alterações histológicas mais acentuadas, com presença de forte infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos, maiores áreas de necrose e degeneração tecidual mais grave em comparação aos animais Smurf1<sup>-/-</sup>. Por outro lado, os animais Smurf1<sup>-/-</sup> infectados com *S. typhimurium* apresentaram alterações teciduais mais discretas, com pouca ou nenhuma área com necrose e menor infiltrado neutrofílico em relação ao fígado dos animais WT infectados (Figura 13).

Os achados histopatológicos observados foram quantificados e os dados representados em gráficos conforme intensidade do processo degenerativo, presença de infiltrado inflamatório, presença de áreas de necrose e escore total observado nos animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> infectados com *S. typhimurium* (Figura 14).



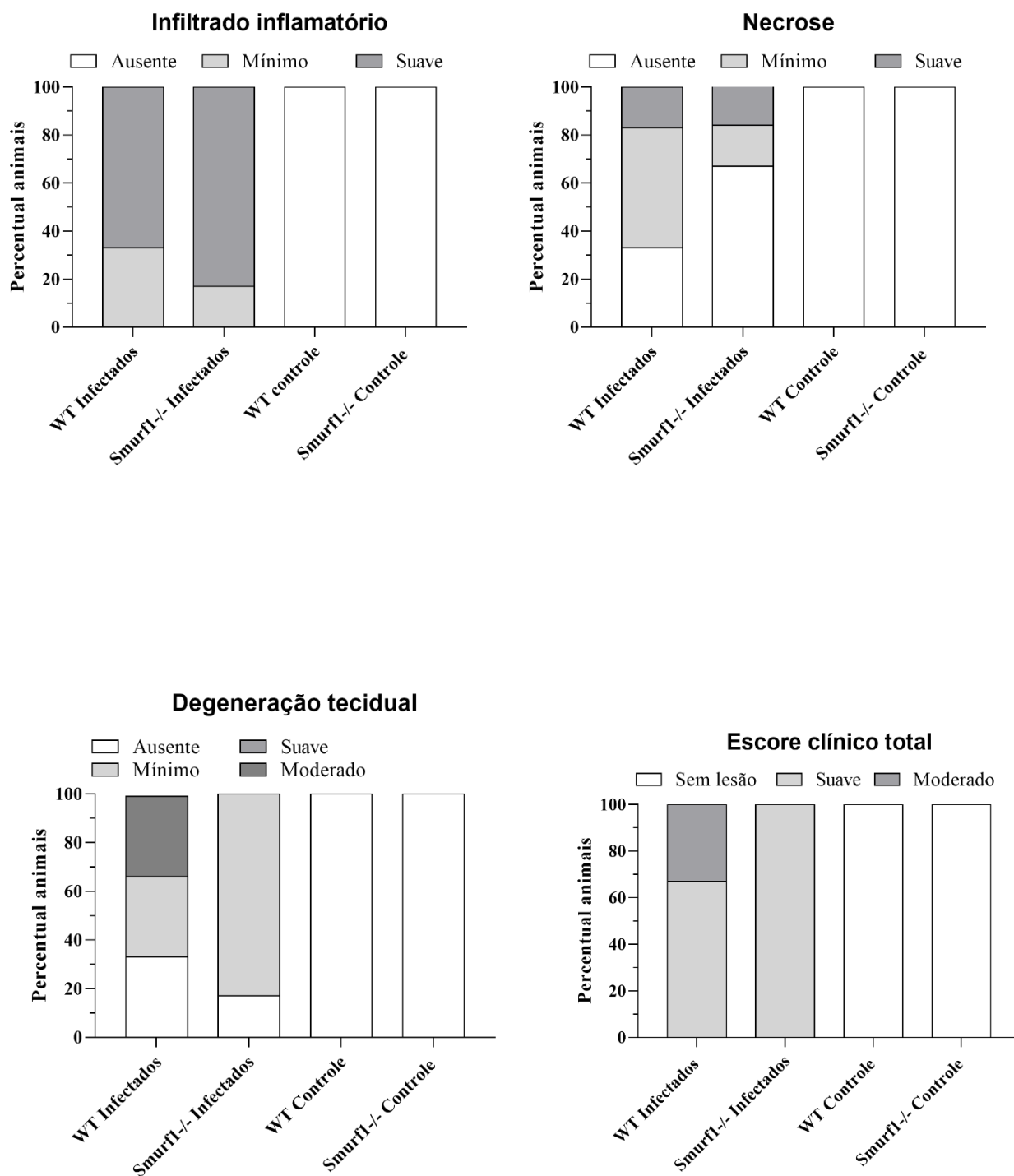
**Figura 12.** Análise histopatológica do pulmão dos animais infectados com *S. typhimurim*. Corte histológico do pulmão de animais WT ou *Smurf1*<sup>-/-</sup> e grupo controle (animais não infectados). A: alvéolos pulmonares; B: bronquíolos; EPC: epitélio pseudoestratificado colunar; VS: vaso sanguíneo. Coloração: hematoxilina-eosina. Barra de escala: 50µm.





**Figura 13.** Análise histopatológica do fígado dos animais infectados com *S. typhimurim*. Corte histológico do fígado de animais WT ou *Smurf1*<sup>-/-</sup> e seus respectivos grupos controles (animais não infectados). VC: veia central; VS: vaso sanguíneo; Ne: áreas de necrose; Seta: hepatócitos; Asterisco: infiltrado inflamatório. Coloração: hematoxilina-eosina. Barra de escala: 50μm.





**Figura 14. Quantificação dos achados histopatológicos do fígado dos animais infectados com *S. typhimurium*.** Animais WT ou Smurf1<sup>-/-</sup> foram infectados via intraperitoneal com 1x10<sup>4</sup> CFU da bactéria *S. typhimurium* e realizado análise histopatológica do fígado. As cores das barras representam a gravidade das alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais infectados. 0: ausente (0%), 1: mínimo (1-20%), 2: leve (21-40%), 3: moderado (41-60%), 4: acentuado (61-80%), 5: grave (81-100%).

## 5. Discussão

---

Smurf1 é uma ubiquitina-ligase que está relacionada a vários processos biológicos importantes do hospedeiro (Cao & Zhang, 2013a). Estudos prévios mostraram que Smurf1 direciona para degradação proteossomal proteínas importantes na sinalização do sistema imune, apresentando uma possível função em atuar na regulação da resposta inflamatória (Lee et al., 2011; S. Li et al., 2010; Y. Wang et al., 2012; Yuan et al., 2012).

Os dados obtidos com esse trabalho mostraram um potencial de Smurf1 em regular a resposta inflamatória de macrófagos. Utilizando LPS para ativar a via de sinalização de TLR4, nossos resultados mostraram que macrófagos deficientes de Smurf1 apresentaram aumento na produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 e maior fosforilação de ERK1/2. Acreditamos que Smurf1 possivelmente regula negativamente a via de TLR4 através da degradação de algum substrato ou proteína importante na cascata de sinalização. Um estudo demonstrou que Smurf1 interagiu diretamente com diversas proteínas da família TRAF, incluindo TRAF6 (S. Li et al., 2010). TRAF6 é uma proteína adaptadora que pertence à superfamília de proteínas TRAF. Foram identificadas seis membros até o momento e somente TRAF6 participa da transdução de sinal dos receptores TNF (TNFR) e também da família dos receptores TLR (T. Kobayashi et al., 2004; Ye et al., 2002). A literatura destaca o papel de TRAF6 em ativar o fator de transcrição NF- $\kappa$ B levando à produção de citocinas inflamatórias (Verstak et al., 2009). Portanto, trabalhamos com a hipótese de que Smurf1 ubiquitina e direciona para degradação proteossomal substratos da família TRAF, apresentando assim um papel central no controle da sinalização da imunidade inata. A ausência intracelular de Smurf1 (como nos macrófagos Smurf1<sup>-/-</sup>) resulta em uma maior disponibilidade de TRAF6 que, durante a sinalização de TLR4 leva a uma produção exacerbada/desregulada de citocinas (Figura 15). Uma vez que TRAF6 atua *upstream* tanto da via das MAPK quanto de NF- $\kappa$ B durante a sinalização de TLR4 (Y. C. Lu et al., 2008) pretendemos também avaliar em macrófagos Smurf1<sup>-/-</sup> a fosforilação de proteínas relacionadas com a via de NF- $\kappa$ B, como a p65, ou a degradação de I $\kappa$ B. Por fim, é

descrito que os receptores Tipo NOD (NLR) e receptores do Tipo I (RIG-I) também utilizam a proteína TRAF6 para sinalização (Taro Kawai & Akira, 2010; Yu & Levine, 2011), levando a considerarmos também a hipótese de que Smurf1 possa desempenhar um papel de regulação em outras vias de sinalização do sistema imune.

Estudos já demonstraram que o LPS pode causar um colapso nos sistemas circulatório e respiratório, promovendo o choque séptico. Nesse modelo que utilizamos, o LPS induziu uma supersecreção de citocinas em macrófagos, principalmente o TNF- $\alpha$  que, em humanos pode acarretar ações locais e sistêmicas no organismo levando à morte do hospedeiro caso não sejam tomadas medidas terapêuticas adequadas e dentro de um curto período de tempo (Tracey, 1992). Embora a resposta imune inata seja crítica para o controle inicial da infecção bacteriana, a produção descontrolada de citocinas inflamatórias pode ser prejudicial e até fatal para o hospedeiro. Compreender como se dá a regulação negativa das vias de sinalização imune é fundamental para aprofundar nossa compreensão em como controlar processos infecciosos e inflamatórios que acometem o organismo.

Os efeitos inibitórios de Smurf1 na regulação da resposta imune descritos neste trabalho foram demonstrados também para outras proteínas com funções variadas. Por exemplo, IRAK-M, uma quinase pertencente à família IRAK e expressa em macrófagos, atua como regulador negativo da via de sinalização dos TLR. BMDM de animais deficientes de IRAK-M estimulados com LPS apresentaram maior produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-6 quando comparados aos BMDM de animais WT (K. Kobayashi et al., 2002). Além da dosagem das citocinas, também foi avaliado se IRAK-M participava da via de ativação das MAPK ou NF- $\kappa$ B. Semelhante a nosso experimento com Smurf1, BMDM de animais WT e KO foram estimulados com LPS e os níveis de fosforilação de ERK1/2 e JNK foram quantificados. Os resultados demonstraram maior nível de fosforilação dessas quinases nos BMDM de animais deficientes para IRAK-M, sugerindo que essa proteína participa da regulação negativa dessas vias em macrófagos. Outro estudo utilizando animais deficientes de SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1R related molecule*) e submetidos ao desafio por LPS,

mostrou que essa proteína funciona como regulador negativo da sinalização de IL-1 e LPS ao apresentarem maior produção de citocinas IL-1 e TNF- $\alpha$  em relação aos animais WT (Wald et al., 2003).

Os dados obtidos com o experimento *in vitro* nos levaram a avaliar se Smurf1 teria um papel na resistência do hospedeiro contra infecções bacterianas *in vivo*. Para testar essa hipótese, trabalhamos com animais WT e deficientes para Smurf1 num modelo experimental utilizando a bactéria *S. typhimurium*. Encontramos na literatura trabalhos demonstrando que os componentes celulares dessa bactéria (LPS e flagelinas, por exemplo) induzem a ativação de diferentes TLR no organismo (Herhaus & Dikic, 2018; Mathur et al., 2012). Animais WT e Smurf1<sup>-/-</sup> foram infectados com *S. typhimurium*, numa dose que simula a condição de choque séptico no animal e após 48 horas alguns parâmetros significativos durante a instalação do processo infeccioso foram analisados. Os dados obtidos demonstraram que os animais deficientes de Smurf1 apresentaram menor replicação bacteriana no fígado e maior número de leucócitos na circulação em relação aos animais WT. Avaliando um contexto de infecção sistêmica, acreditamos que essa menor replicação bacteriana dos animais Smurf1<sup>-/-</sup> se deve à maior circulação de leucócitos observada no sangue e também ao aumento na produção de citocinas e fatores antimicrobianos que estariam atuando no controle da infecção bacteriana. Uma hipótese é que as citocinas inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$ , podem estar atuando sobre a medula óssea estimulando a produção de mais células mielóides, por isso o aumento na produção de leucócitos circulantes no sangue dos animais Smurf1<sup>-/-</sup>. Os resultados de CFU são condizentes com os dados obtidos através da análise histopatológica do fígado, na qual os animais Smurf1<sup>-/-</sup> apresentaram menores danos teciduais em relação aos animais WT. Esse fato se deve à menor replicação bacteriana nesses animais, conseqüentemente, menores áreas de necrose tecidual e infiltrados inflamatórios em relação aos animais WT.

Os resultados obtidos pelo experimento *in vivo* são apoiados por pesquisas na literatura que sustentam a hipótese de que Smurf1 pode ser um fator importante do hospedeiro na regulação da resposta imune inata. Um estudo com camundongos

deficientes em NLRP12 demonstrou que essa proteína desempenha um papel similar a Smurf1 no controle da resposta inata. Animais deficientes de NLRP12 foram mais resistentes à infecção por *S. typhimurim*, quando comparados aos animais WT, destacando o papel do NLRP12 como regulador negativo da sinalização imune inata durante a infecção por *S. typhimurium* (Zaki et al., 2014).

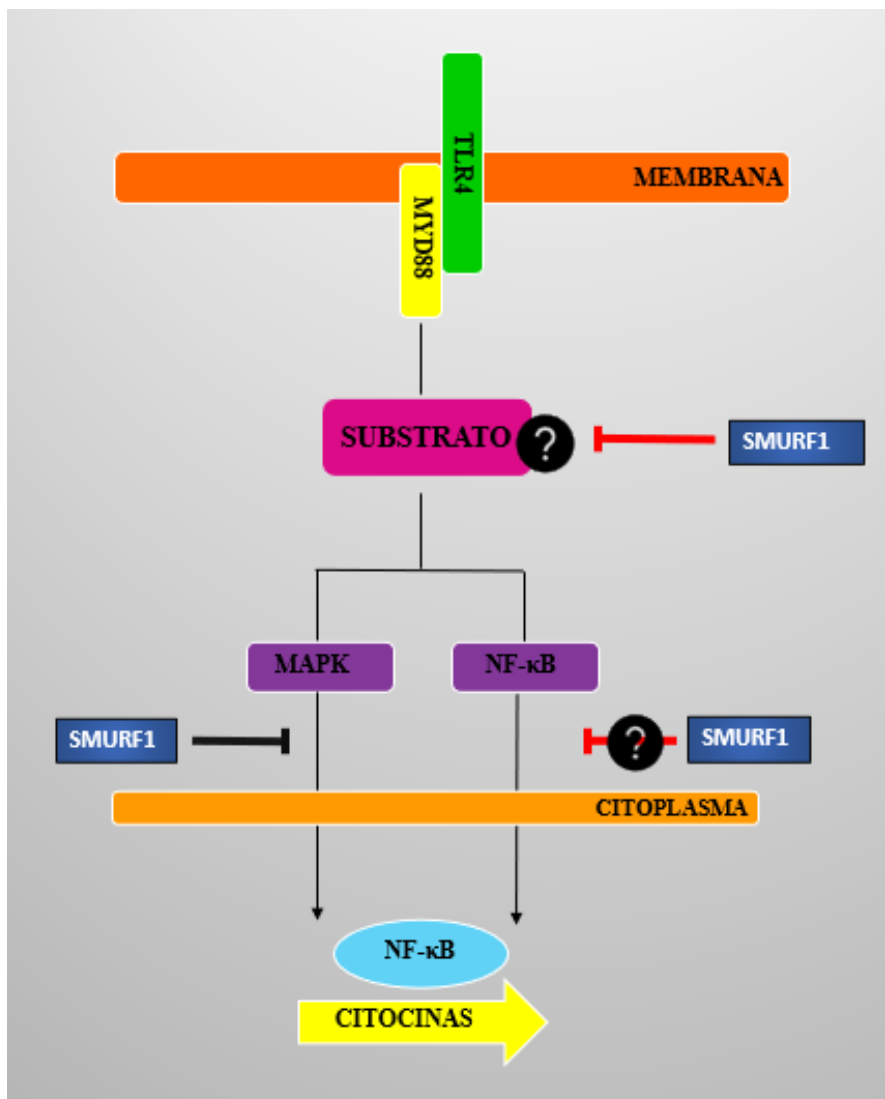
Em relação aos dados obtidos quanto à sobrevivência dos animais Smurf1<sup>-/-</sup> e WT após infecção com a bactéria *S. typhimurium*, não observamos diferenças estatísticas na análise dos dados, apesar de notarmos que parte dos animais Smurf1<sup>-/-</sup> permaneceram vivos ao final do experimento (não perderam 20 % da massa corpórea). Porém, mesmo não tendo sucumbido à infecção, estes animais apresentaram condições clínicas muito comprometidas (mobilidade reduzida, postura prejudicada, respiração ofegante e olhos com presença de secreção) e tiveram que ser sacrificados. Acreditamos que de maneira geral, os animais Smurf1 apresentaram uma tendência de sobreviver mais à infecção, quando comparados aos animais WT, já que apresentaram menor replicação bacteriana e melhores condições histopatológicas no fígado. Sugerimos que esta maior tendência de resistência dos animais Smurf1<sup>-/-</sup> esteja ligada à maior produção de fatores inflamatórios e antimicrobianos nestes animais. Para obtermos resultados mais claros será realizada adequação da dose administrada de bactérias com o objetivo de promover um tempo maior de sobrevivência e termos melhores condições de avaliar se há uma diferença significativa entre os fenótipos pós-infecção.

Baseado nos resultados encontrados até o momento, nossa hipótese de trabalho (Figura 15) sobre o papel desempenhado por Smurf1 na regulação da resposta imune inata é que Smurf1 atua marcando para ubiquitinação e degradação algum substrato celular relacionado com a regulação negativa da sinalização de TLR4. Essa suposição é apoiada por trabalhos que descrevem a atuação de Smurf1 na regulação da resposta imune. Estudos demonstraram que um dos mecanismos inibitórios da sinalização de TLR4 mediado por TGF- $\beta$  é dependente da ubiquitinação e degradação proteossomal de MyD88 mediada por Smurf1 (Lee et al., 2011). Outros autores evidenciaram que Smurf1 interagiu fisicamente com STAT1 induzindo sua ubiquitinação e degradação

(Yuan et al., 2012). Em outros experimentos com células HEK, Smurf1 interagiu com MAVS, MEKK2 ou com T $\beta$ RI induzindo a ubiquitinação e degradação proteossomal desses substratos (Ebisawa et al., 2001; Y. Wang et al., 2012; Wen et al., 2015).

Compreender os mecanismos celulares que atuam na regulação da resposta imune inata contribuirá para o desenvolvimento de novos fármacos e terapias contra as doenças infecciosas bacterianas e até mesmo doenças inflamatórias (Anwar et al., 2013; Cao & Zhang, 2013b; Drews & Taegtmeier, 2014; Lehman, 2009; Rolfe et al., 1997). Novas estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas para tratar choque séptico e infecções bacterianas. A literatura descreve a dificuldade em encontrar novos antibióticos para controlar os processos infecciosos e novas formas de tratamento devem ser avaliadas (Antimicrobial Resistance Division & Partnership, 2020).

Nossa perspectiva é continuar as pesquisas com os BMDM para dosagem de outras citocinas, avaliarmos a produção de óxido nítrico, realizar análise CFU nessas células utilizando modelo de infecção por *S. typhimurium* e tentarmos identificar a participação de Smurf1 em outras vias de sinalização mediadas por TLR4, como NF- $\kappa$ B. Em relação aos experimentos *in vivo*, nosso objetivo é realizar a repetição do teste de sobrevivência dos animais WT e Smurf1<sup>-/-</sup> a fim de identificarmos possíveis alterações entre os dois fenótipos. Além disso, pretendemos dosar as citocinas no sangue desses animais e trabalharmos com inibidores/estimuladores da via de ERK1/2. Outra possibilidade de trabalho futuro é o início de ensaios para identificarmos o papel dos diferentes domínios estruturais de Smurf1 na sinalização da resposta imune. Os autores Franco et al., 2017 demonstraram que o domínio C2 de Smurf1 promove seu recrutamento e localização em vacúolos contendo *M. tuberculosis*, e a atividade catalítica do domínio HECT é essencial em mediar a autofagia seletiva antibacteriana. Baseado nessas informações, é possível que o mecanismo de atuação de Smurf1 na sinalização de NF- $\kappa$ B e resposta inflamatória de macrófagos possa ser dependente dos domínios HECT (catalítico) e C2 (recrutamento de membranas).



**Figura 15. Hipótese de trabalho.** Smurf1 pode atuar como um regulador negativo na sinalização do TLR4. Os pontos de interrogação representam possíveis substratos de Smurf1.

## 6. Conclusão

---

Este trabalho conclui que a E3 ubiquitina-ligase Smurf1 pode atuar como um regulador negativo da ativação da via ERK1/2 em macrófagos e desempenha um papel crítico na regulação da imunidade inata contra infecções causadas pela bactéria *Salmonella typhimurium*. Portanto, Smurf1 é um fator do hospedeiro importante na manutenção da homeostase do sistema imunológico.



## 7. Bibliografia

---

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>

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>

Antimicrobial Resistance Division, & Partnership, G. C. and. (2020). *2020 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303>

Anwar, M. A., Basith, S., & Choi, S. (2013). Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Experimental and Molecular Medicine*, *45*(2). <https://doi.org/10.1038/emm.2013.28>

Bibeau-Poirier, A., & Servant, M. J. (2008). Roles of ubiquitination in pattern-recognition receptors and type I interferon receptor signaling. *Cytokine*, *43*(3), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.012>

British Society for Immunology. (2019). *Pattern recognition receptors (PRRs): toll-like receptors*. 38–40. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/receptors-and-molecules/pattern-recognition-receptors-prrs>

Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G. N., & Martin, M. (2011). TLR-signaling networks: An integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *Journal of Dental Research*, *90*(4), 417–427. <https://doi.org/10.1177/0022034510381264>

Broz, P., Ohlson, M. B., & Monack, D. M. (2012). *typhimurium* , a model enteric pathogen © 2012 Landes Bioscience . 0976. <https://doi.org/10.4161/gmic.19141>

Cao, Y., & Zhang, L. (2013a). A Smurf1 tale: Function and regulation of an ubiquitin ligase in multiple cellular networks. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 70, Issue 13). <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1170-7>

- Cao, Y., & Zhang, L. (2013b). Pharmaceutical Perspectives of HECT-TYPE Ubiquitin Ligase Smurf1. *Current Pharmaceutical Design*, *19*(18), 3226–3233. <https://doi.org/10.2174/1381612811319180007>
- Cheng, P. L., Lu, H., Shelly, M., Gao, H., & Poo, M. M. (2011). Phosphorylation of E3 ligase smurf1 switches its substrate preference in support of axon development. *Neuron*, *69*(2), 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.021>
- Clough, J. D. (2018). Immune recognition. *Suppressor Cells and Their Factors*, 3–20. <https://doi.org/10.1201/9781351077026>
- Drews, O., & Taegtmeier, H. (2014). Targeting the ubiquitin-proteasome system in heart disease: The basis for new therapeutic strategies. *Antioxidants and Redox Signaling*, *21*(17), 2322–2343. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5823>
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., & Miyazono, K. (2001). Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor- $\beta$  Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(16), 12477–12480. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100008200>
- 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>
- Fajner, V., Maspero, E., & Polo, S. (2017). Targeting HECT-type E3 ligases – insights from catalysis, regulation and inhibitors. *FEBS Letters*, *591*(17), 2636–2647. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12775>
- Fei, C., He, X., Xie, S., Miao, H., Zhou, Z., & Li, L. (2014). Smurf1-mediated Axin ubiquitination requires Smurf1 C2 domain and is cell cycle-dependent. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(20), 14170–14177. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.536714>
- Finley, D., & Chau, V. (1991). UBIQUITINATION Enzymes of the Ubiquitin System ..... General Functions of

Intracellular Protein Turnover ..... Scope of Ubiquitin-Mediated Pr. *Elements*, 25–69.

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>

Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., & Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*, 119(6), 753–766. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.038>

Hajam, I. A., Dar, P. A., Shahnawaz, I., Jaume, J. C., & Lee, J. H. (2017). Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. *Experimental and Molecular Medicine*, 49(9), 1–15. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.172>

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>

Hoebe, K., Janssen, E., & Beutler, B. (2004). *Hoebe, Janssen y Beutler*. 5(10), 971–974.

Horvat, J. C., Beagley, K. W., Wade, M. A., Preston, J. A., Hansbro, N. G., Hickey, D. K., Kaiko, G. E., Gibson, P. G., Foster, P. S., & Hansbro, P. M. (2007). Neonatal chlamydial infection induces mixed T-cell responses that drive allergic airway disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(6), 556–564. <https://doi.org/10.1164/rccm.200607-1005OC>

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>

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>

Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 13(5), 816–825. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>

Kawai, Taro, & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>

Ke, M., Mo, L., Li, W., Zhang, X., Li, F., & Yu, H. (2017). Ubiquitin ligase SMURF1 functions as a prognostic marker and promotes growth and metastasis of clear cell renal cell carcinoma. *FEBS Open Bio*, 7(4), 577–586. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12204>

Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galán, J. E., Janeway, C. A., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 110(2), 191–202. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00827-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00827-9)

Kobayashi, T., Walsh, M. C., & Choi, Y. (2004). The role of TRAF6 in signal transduction and the immune response. *Microbes and Infection*, 6(14), 1333–1338. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.09.001>

Korneev, K. V. (2019). Mouse Models of Sepsis and Septic Shock. *Molecular Biology*, 53(5), 704–717. <https://doi.org/10.1134/S0026893319050108>

Kwon, A., Lee, H. L., Woo, K. M., Ryoo, H. M., & Baek, J. H. (2013). SMURF1 plays a role in EGF-induced breast cancer cell migration and invasion. *Molecules and Cells*, 36(6), 548–555. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0233-4>

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- $\beta$ 1-induced degradation of MyD88 in TLR4 signalling. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1469>

Lehman, N. L. (2009). The ubiquitin proteasome system in neuropathology. *Acta Neuropathologica*, *118*(3), 329–347. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0560-x>

Li, J., Chai, Q. Y., & Liu, C. H. (2016). The ubiquitin system: A critical regulator of innate immunity and pathogen-host interactions. *Cellular and Molecular Immunology*, *13*(5), 560–576. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.40>

Li, S., Lu, K., Wang, J., An, L., Yang, G., Chen, H., Cui, Y., Yin, X., Xie, P., Xing, G., He, F., & Zhang, L. (2010). Ubiquitin ligase Smurf1 targets TRAF family proteins for ubiquitination and degradation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *338*(1–2), 11–17. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0315-y>

Lu, K., Li, P., Zhang, M., Xing, G., Li, X., Zhou, W., Bartlam, M., Zhang, L., Rao, Z., & He, F. (2011). Pivotal role of the C2 domain of the smurf1 ubiquitin ligase in substrate selection. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(19), 16861–16870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211979>

Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, *42*(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>

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>

Mathur, R., Oh, H., Zhang, D., Park, S. G., Seo, J., Koblansky, A., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2012). A mouse model of salmonella typhi infection. *Cell*, *151*(3), 590–602. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.042>

Miao, E. A., & Warren, S. E. (2010). Innate immune detection of bacterial virulence factors via the NLRC4 inflammasome. *Journal of Clinical Immunology*, *30*(4), 502–506. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9386-5>

Nalepa, G., Rolfe, M., & Harper, J. W. (2006). Drug discovery in the ubiquitin - Proteasome system. *Nature Reviews Drug Discovery*, *5*(7), 596–613. <https://doi.org/10.1038/nrd2056>

Narimatsu, M., Bose, R., Pye, M., Zhang, L., Miller, B., Ching, P., Sakuma, R., Luga, V., Roncari, L., Attisano, L., & Wrana, J. L. (2009). Regulation of Planar Cell Polarity by Smurf Ubiquitin Ligases. *Cell*, *137*(2), 295–307. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.025>

Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., & Tanaka, K. (2016). The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- $\kappa$ B Signaling. *Molecular Cell*, *64*(2), 251–266. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.014>

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](https://doi.org/10.1136/ard.62.suppl_2.ii17)

Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H. R., Zhang, Y., & Wrana, J. L. (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGF $\beta$  receptors controls epithelial cell plasticity. *Science*, *307*(5715), 1603–1609. <https://doi.org/10.1126/science.1105718>

Peri, F., Piazza, M., Calabrese, V., Damore, G., & Cighetti, R. (2010). Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules. *Biochemical Society Transactions*, *38*(5), 1390–1395. <https://doi.org/10.1042/BST0381390>

Petroski, M. D. (2008). The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochemistry*, *9*(SUPPL. 1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-S1-S7>

Qureshi, S., Al-Shabanah, O. A., Al-Harbi, M. M., Al-Bekairi, A. M., & Raza, M. (2001). Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. *Toxicology*, *165*(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00396-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00396-1)

Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Mnorp, K. I., Gros, P., & Malo, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *Pneumologie*, *53*(9), 615–625.

Rolfe, M., Chiu, M. I., & Pagano, M. (1997). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. *Journal of Molecular Medicine*, *75*(1), 5–17. <https://doi.org/10.1007/s001090050081>

- Rotin, D., & Kumar, S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(6), 398–409. <https://doi.org/10.1038/nrm2690>
- Royle, M. C. J., Töttemeyer, S., Alldridge, L. C., Maskell, D. J., & Bryant, C. E. (2003). Stimulation of Toll-Like Receptor 4 by Lipopolysaccharide During Cellular Invasion by Live *Salmonella typhimurium* Is a Critical But Not Exclusive Event Leading to Macrophage Responses. *The Journal of Immunology*, *170*(11), 5445–5454. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5445>
- Saitoh, T., & Akira, S. (2010). Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *Journal of Cell Biology*, *189*(6), 925–935. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002021>
- Santos, R. L., Zhang, S., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Garry Adams, L., & Bäumlner, A. J. (2001). Animal models of *Salmonella* infections: Enteritis versus typhoid fever. *Microbes and Infection*, *3*(14–15), 1335–1344. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01495-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01495-2)
- Seibert, S. A., Mex, P., Köhler, A., Kaufmann, S. H. E., & Mittrücker, H. W. (2010). TLR2-, TLR4- and Myd88-independent acquired humoral and cellular immunity against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Immunology Letters*, *127*(2), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.10.008>
- Shrum, B., Anantha, R. V., Xu, S. X., Donnelly, M., Haeryfar, S. M. M., McCormick, J. K., & Mele, T. (2014). A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Research Notes*, *7*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-233>
- Sluimer, J., & Distel, B. (2018). Regulating the human HECT E3 ligases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(17), 3121–3141. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2848-2>
- Smit, J. J., Sixma, T. K., Irp, H., & Ring, I. (2014). RBR E3 -ligases at work. *EMBO Reports*, *15*(2), 142–154.

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>

Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, *17*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>

Tracey, K. J. (1992). TNF and other cytokines in the metabolism of septic shock and cachexia. *Clinical Nutrition*, *11*(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0261-5614\(92\)90056-V](https://doi.org/10.1016/0261-5614(92)90056-V)

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>

Tyrrell, C. (2009). *Host Defence Peptides*.

Verstak, B., Nagpal, K., Bottomley, S. P., Golenbock, D. T., Hertzog, P. J., & Mansell, A. (2009). MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP interaction with TRAF6 is critical for TLR2- and TLR4-mediated NF- $\kappa$ B proinflammatory responses. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(36), 24192–24203. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.023044>

Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J. E., Stark, G. R., & Li, X. (2003). SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor - Interleukin 1 receptor signaling. *Nature Immunology*, *4*(9), 920–927. <https://doi.org/10.1038/ni968>

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>

Wang, M., Guo, L., Wu, Q., Zeng, T., Lin, Q., Qiao, Y., Wang, Q., Liu, M., Zhang, X., Ren, L., Zhang, S., Pei, Y., Yin, Z., Ding, F., & Wang, H. R. (2014). ATR/Chk1/Smurf1 pathway determines cell fate after DNA damage by controlling RhoB abundance. *Nature Communications*, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms5901>



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>

Wang, Z., & Li, C. (2020). Xenophagy in innate immunity: A battle between host and pathogen. *Developmental and Comparative Immunology*, *109*(March), 103693. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103693>

Weber, J., Polo, S., & Maspero, E. (2019). HECT E3 ligases: A tale with multiple facets. *Frontiers in Physiology*, *10*(APR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00370>

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>

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>

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>

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>

Ye, H., Arron, J. R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N. K., Segal, D., Dzivenu, O. K., Vologodskaya, M., Yim, M., Du, K., Singh, S., Pike, J. W., Darnay, B. G., Choi, Y., & Wu, H. (2002). Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature*, *418*(6896), 443–447. <https://doi.org/10.1038/nature00888>

Ying, S. X., Hussain, Z. J., & Zhang, Y. E. (2003). Smurf1 facilitates myogenic differentiation and antagonizes the bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast conversion by targeting Smad5 for degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 39029–39036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301193200>

Yu, M., & Levine, S. J. (2011). Toll-like receptor 3, RIG-I-like receptors and the NLRP3 inflammasome: Key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 22(2), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.02.001>

Yuan, C., Qi, J., Zhao, X., & Gao, C. (2012). Smurf1 protein negatively regulates interferon- $\gamma$  signaling through promoting STAT1 protein ubiquitination and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(21), 17006–17015. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341198>

Zaki, M. H., Man, S. M., Vogel, P., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T. D. (2014). Salmonella exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 385–390. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317643111>

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>

Zhao, M., Qiao, M., Harris, S. E., Oyajobi, B. O., Mundy, G. R., & Chen, D. (2004). Smurf1 Inhibits Osteoblast Differentiation and Bone Formation in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12854–12859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313294200>

Zhao, M., Qiao, M., Oyajobi, B. O., Mundy, G. R., & Chen, D. (2003). E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor  $\alpha$ 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>

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>