

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

Luiz Pedro de Souza Costa

**PARTICIPAÇÃO DA UBIQUITINA-LIGASE SMURF1 NA MODULAÇÃO DA
IMUNOPATOLOGIA CAUSADA PELA INFECÇÃO POR BETACORONAVIRUS**

BELO HORIZONTE

2025

Luiz Pedro de Souza Costa

**PARTICIPAÇÃO DA UBIQUITINA-LIGASE SMURF1 NA MODULAÇÃO DA
IMUNOPATOLOGIA CAUSADA PELA INFECÇÃO POR BETACORONAVIRUS**

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

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Franco

Coorientadora: Profa. Dra. Vivian Vasconcelos
Costa

BELO HORIZONTE

2025

043

Costa, Luiz Pedro de Souza.

Participação da ubiquitina-ligase Smurf1 na modulação da imunopatologia causada pela infecção por Betacoronavirus [manuscrito] / Luiz Pedro de Souza Costa. – 2025.

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

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Franco. Coorientadora: Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Ubiquitinação. 3. Betacoronavirus. 4. Inflamação. 5. Macrófagos. I. Franco, Luís Henrique. II. Litwinski, Vivian Vasconcelos Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



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



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE LUIZ PEDRO DE SOUZA COSTA.
Aos seis dias do mês de fevereiro de 2025 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Participação da ubiquitina-ligase Smurf1 na modulação da imunopatologia causada pela infecção por betacoronavírus", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Luis Henrique Franco, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. José Luiz Proença Modena (Universidade Estadual de Campinas), aprovado; Dr. Leandro Licursi de Oliveira (Universidade Federal de Viçosa), aprovado; Dr. Sergio Costa Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Vanessa Pinho (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Luis Henrique Franco - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

(X) APROVADO

() REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 06 de fevereiro de 2025.

Dr. José Luiz Proença Modena (Unicamp)

Documento assinado digitalmente
gov.br LEANDRO LICURSI DE OLIVEIRA
Data: 07/02/2025 09:41:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Leandro Licursi de Oliveira (UFV)

Documento assinado digitalmente
gov.br SERGIO COSTA OLIVEIRA
Data: 07/02/2025 09:20:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Sergio Costa Oliveira (UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br VANESSA PINHO DA SILVA
Data: 07/02/2025 09:15:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Vanessa Pinho (UFMG)

Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski - Coorientador (UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br VIVIAN VASCONCELOS COSTA LITWINSKI
Data: 07/02/2025 10:28:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Luis Henrique Franco - Orientador (UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSE LUIZ PROENCA MODENA
Data: 07/02/2025 10:50:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br LUIS HENRIQUE FRANCO
Data: 07/02/2025 08:59:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dedico este trabalho ao meu Senhor Jesus Cristo,
minha mãe, amigos e professores que
tanto auxiliaram neste crescimento.**

AGRADECIMENTOS

O doutorado representa tanto o encerramento quanto o início de uma grande jornada, iniciada na graduação e marcada pelo encontro com muitas pessoas ao longo do caminho. Vale ressaltar que muitas pessoas fazem parte dessa conquista, pois foi uma jornada desafiadora e árdua, mas nunca sozinha. Com infinita misericórdia, Deus colocou pessoas especiais ao meu lado durante essa trajetória, e a elas dedico minha gratidão.

Primeiramente quero agradecer ao meu amado e Senhor da minha vida JESUS, a Ele toda honra, toda glória e todo louvor. Sem Ele nada disso seria possível! Ele guiou-me até aqui, abriu portas e caminhos, fortaleceu-me nos momentos mais difíceis, concedeu-me paz e ensinou o verdadeiro significado da palavra **resiliência**, que esteve presente em toda essa jornada.

A saudade hoje dói e dói muito, mas sou eternamente grato a mulher, guerreira e ser humano mais incrível que conheci na vida, minha **mãe** Maria Gecilda. Obrigado por sempre acreditar em mim, por acreditar nos meus sonhos quando eu mesmo não acreditava. Você é meu maior exemplo e inspiração, obrigado por me deixar ser seu filho.

Ao meu pai, João Azevedo, que também já se foi, mas sempre torceu para o meu sucesso e sempre falava com orgulho do filho que tinha. Minha eterna gratidão pelo homem que foi, acredito que fez o melhor que podia.

Aos irmãos que já partiram, Verônica Sabrina, Antônio Marcos e Edemelson, sei que hoje se estivessem aqui estariam felizes por essa conquista, principal a Verônica que sempre guardava uma foto de formatura minha.

Aos irmãos ainda presentes, Ellen Cintia, Elmara, João e Raimundo, acredito sinceramente que, apesar de nossas diferenças, no fundo de seus corações, vocês compartilham da minha felicidade por essa conquista.

Ao meu namorado, Waeliton Almeida, e à sua família, minha eterna gratidão pelo apoio incondicional durante toda essa jornada. Vocês tornaram esse processo mais leve e especial. Sou imensamente grato por cada fim de semana compartilhado, pelas datas comemorativas, pelas viagens e por toda a alegria que vivemos juntos. Obrigado por sempre me incluírem em tudo e por me fazerem sentir parte da família.

Aos meus amigos e irmãos do coração, Jordana, Felipe, Danielle e Fernanda, a famosa “panelinha”. Vocês foram um presente de Deus para me ajudar a enfrentar essa longa jornada. Sou imensamente grato pelas conversas, pelas risadas, pelos momentos de entretenimentos, pelo companheirismo, pela amizade e por todo o apoio incondicional que recebi. Vocês foram verdadeiros irmãos ao longo desse caminho.

Às minhas queridas companheiras e amigas de casa, Claudiana e Maria, minha profunda gratidão por cada momento compartilhado. Juntos, vivemos conversas, dividimos lágrimas nos momentos difíceis e multiplicamos risadas nos instantes de alegria. Mais do que simples colegas de moradia, construímos um verdadeiro lar. Criamos laços que vão muito além do dia a dia, formando uma família que sempre levarei no coração.

Esse trabalho jamais seria possível sem ele, meu orientador e pai-científico, Prof. Dr. Luís Franco. Lembro-me do dia em que conversamos e, mesmo sem me conhecer, você me aceitou como seu aluno, acolhendo-me com prontidão em seu pequeno e aconchegante grupo de pesquisa. Obrigado pela oportunidade, pelas conversas, pelos ensinamentos e, principalmente, pelas correções, sem isso não teria crescido durante este processo.

Agradeço a essa mulher tão dedicada, amiga, solidária, durona, coorientadora e mãe-científica Profa. Dra. Vivian Vasconcelos, carinhosamente chamada de “Vivi”. Não há palavras que expressem a imensa gratidão que sinto por tudo que fez por mim. Sou especialmente grato por me aceitar em seu grande grupo de pesquisa, por me acolher nos momentos de fragilidade, pelas conversas sinceras e profundas, pelos valiosos ensinamentos, pelas correções e até mesmo pelos necessários “puxões de orelha”. Você é uma mulher incrível!

Aos estimados professores da UFAM, Dr. José Fernando, Dra. Maria do Carmo, Dra. Rosilene Gomes, Dra. Jerusa Araújo e Dra. Lorena Nacif, minha mais profunda gratidão por todo o apoio moral, pelos conselhos valiosos e pela amizade. Foi graças a vocês, que acreditaram no meu sonho desde o início, que essa caminhada se tornou possível.

Às minhas parceiras e amigas, Liliane, Rafaela, Ingredy, Natália, Rayane e Joseane, minha sincera gratidão por estarem sempre presentes e dispostas a ajudar no que fosse necessário. Obrigado pelas conversas que trouxeram conforto e motivação, pelos cafés que renovaram as energias e, principalmente, pela companhia diária, que fez toda a diferença ao longo desse percurso.

Ao grupo de pesquisa GPAv, Matheus, Victor, Jenniffer, Letícia, Felipe, Viviane, Amanda, Talita, Thamara, Celso, Bárbara, Ian, Filipe e Larisse. A vocês eu deixo meu muito obrigado por cada momento, pelos longos experimentos, debates intelectuais, ensinamentos, reuniões de laboratório e acima de tudo risadas, é muito bom fazer parte dessa equipe.

Aos queridos do G3, em especial a Rose, Ilma, Vinícius, Débora e Pedro, obrigado por todo carinho, conversas, apoio e suporte durante toda essa caminhada.

Ao pessoal do LIDI, minha sincera gratidão pelo apoio incondicional, mesmo tendo chegado mais recentemente à minha jornada. Um agradecimento especial à Sandra, que sempre esteve disposta a ajudar, oferecendo não apenas suporte, mas também conselhos valiosos.

Aos professores do grupo de Imunofarmacologia, minha sincera gratidão, em especial ao Prof. Mauro Teixeira, Prof. Renato Santana e Prof. Pedro Guimarães, por disponibilizarem os recursos de seus laboratórios, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos membros da banca por aceitarem compor e contribuir com esse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia.

À Capes, CNPq e Fapemig pelo apoio financeiro.

*Eu sou a videira e vós os ramos; o que permanece em Mim e Eu nele,
este dá muitos frutos; porque separados de Mim nada podeis fazer.
(João 15:5)*

RESUMO

A COVID-19 é uma doença causada pelo SARS-CoV-2, pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, e caracteriza-se por intensa inflamação sistêmica, associada à produção elevada de citocinas e quimiocinas. Os *Betacoronavirus* podem desencadear uma resposta inflamatória exacerbada, que o hospedeiro precisa regular para evitar danos excessivos. Um dos principais mecanismos envolvidos nesse controle é a ubiquitinação, um processo pós-traducional no qual moléculas de ubiquitina são covalentemente ligadas a proteínas-alvo, promovendo sua degradação ou modificação funcional para ajustar a resposta imune. Entre as proteínas envolvidas na ubiquitinação, destaca-se a Smurf1, uma E3 ubiquitina-ligase que catalisa a ubiquitinação e a degradação proteossomal de vários substratos proteicos relacionados a respostas inflamatórias e sinalização antiviral. Dados recentes indicam que o mRNA de Smurf1 é altamente expresso em swabs de nasofaringe e orofaringe de pacientes com COVID-19, o que sugere que Smurf1 pode atuar na regulação das respostas imunes durante a infecção por *Betacoronavirus*. O presente estudo investigou a importância de Smurf1 na imunidade antiviral e sua regulação na resposta inflamatória, utilizando modelos de infecção com coronavírus murinos MHV-3 e MHV-A59, que apresentam diferentes graus de patogenicidade. Experimentos *in vitro* mostraram que, na infecção de macrófagos com MHV-3, Smurf1 regulou negativamente a produção de CXCL1, sem impactar o título viral ou a viabilidade celular. Em contraste, na infecção por MHV-A59, Smurf1 reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e CXCL1, controla a replicação viral e preserva a viabilidade celular. A avaliação *in vivo* também revelou diferenças importantes. Camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados por via intranasal com MHV-3 não apresentaram alterações na sobrevivência entre os grupos. Nos parâmetros hematológicos, os camundongos *Smurf1*^{-/-} tiveram um aumento de granulócitos e linfopenia, levando a uma maior razão granulócito/linfócito. No entanto, não foram observadas diferenças significativas no título viral, no dano tecidual ou na produção de mediadores inflamatórios no pulmão. No entanto, a ausência de Smurf1 levou a um aumento discreto em regiões necróticas no fígado. Na infecção por MHV-A59, camundongos *Smurf1*^{-/-} mostraram maior suscetibilidade, com morte precoce em infecções letais e sinais de inflamação sistêmica exacerbada. A expressão de Smurf1 no pulmão foi essencial para controlar a replicação viral, regulando negativamente o mRNA de IFN- β e modulando o perfil inflamatório de macrófagos e neutrófilos. No fígado, Smurf1 não influenciou diretamente a expressão do mRNA de IFN- β , mas aumentou TNF e iNOS em neutrófilos e reduziu TNF em macrófagos. Além disso, camundongos *Smurf1*^{-/-} apresentaram maior dano hepático, evidenciado por níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), sugerindo lesão tecidual significativa. Esses achados destacam que Smurf1 exerce funções distintas dependendo do contexto viral. Enquanto na infecção por MHV-3 seu papel foi modesto, na infecção por MHV-A59 Smurf1 foi fundamental para a regulação da resposta inflamatória e proteção contra danos sistêmicos. A ausência de Smurf1 levou a resposta inflamatória descontrolada, aumento da replicação viral e maior mortalidade, ressaltando seu papel crítico na imunidade antiviral e na homeostase inflamatória. Esses resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos imunológicos mediados por Smurf1 e sugerem que essa proteína pode ser um alvo terapêutico potencial no combate a infecções por *Betacoronavirus*.

Palavras-chave: Smurf1, Betacoronavirus, inflamação, macrófagos.

ABSTRACT

COVID-19 is a disease caused by SARS-CoV-2, belonging to the *Betacoronavirus* genus, and is characterized by intense systemic inflammation associated with elevated production of cytokines and chemokines. Betacoronaviruses can trigger an exacerbated inflammatory response, which the host must regulate to prevent excessive damage. One of the main mechanisms involved in this regulation is ubiquitination, a post-translational process in which ubiquitin molecules are covalently attached to target proteins, promoting their degradation or functional modification to adjust the immune response. Among the proteins involved in ubiquitination, Smurf1 stands out as an E3 ubiquitin ligase that catalyzes the ubiquitination and proteasomal degradation of various protein substrates related to inflammatory responses and antiviral signaling. Recent data indicate that Smurf1 mRNA is highly expressed in nasopharyngeal and oropharyngeal swabs from COVID-19 patients, suggesting that Smurf1 may regulate immune responses during *Betacoronavirus* infection. This study investigated the importance of Smurf1 in antiviral immunity and its regulation of the inflammatory response using infection models with the murine coronaviruses MHV-3 and MHV-A59, which exhibit different degrees of pathogenicity. In vitro experiments showed that in macrophage infection with MHV-3, Smurf1 negatively regulated CXCL1 production without affecting viral titers or cell viability. In contrast, during MHV-A59 infection, Smurf1 reduced the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF and CXCL1, controlled viral replication, and preserved cell viability. *In vivo* evaluation also revealed important differences. Wild-type or *Smurf1*^{-/-} mice infected intranasally with MHV-3 showed no differences in survival between groups. In hematological parameters, *Smurf1*^{-/-} mice exhibited increased granulocytes and lymphopenia, leading to a higher granulocyte-to-lymphocyte ratio. However, no significant differences were observed in viral titers, tissue damage, or inflammatory mediator production in the lungs. Nevertheless, the absence of Smurf1 led to a slight increase in necrotic regions in the liver. In MHV-A59 infection, *Smurf1*^{-/-} mice showed increased susceptibility, with early death in lethal infections and signs of exacerbated systemic inflammation. Smurf1 expression in the lungs was essential for controlling viral replication by negatively regulating IFN- β mRNA and modulating the inflammatory profile of macrophages and neutrophils. Smurf1 did not directly influence IFN- β mRNA expression in the liver but increased TNF and iNOS in neutrophils while reducing TNF in macrophages. Additionally, *Smurf1*^{-/-} mice exhibited greater liver damage, evidenced by elevated alanine aminotransferase (ALT) levels and aspartate aminotransferase (AST), suggesting significant tissue injury. These findings highlight that Smurf1 exerts distinct functions depending on the viral context. While its role was modest in MHV-3 infection, Smurf1 was crucial in MHV-A59 infection for regulating the inflammatory response and protecting against systemic damage. The absence of Smurf1 led to uncontrolled inflammation, increased viral replication, and higher mortality, underscoring its critical role in antiviral immunity and inflammatory homeostasis. These results contribute to the understanding of Smurf1-mediated immune mechanisms and suggest that this protein may be a potential therapeutic target for combating *Betacoronavirus* infections.

Keywords: Smurf1, Betacoronavirus, inflammation, macrophages.

LISTA DE INLUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura viral dos vírus pertencentes ao gênero <i>Betacoronavirus</i>	12
Figura 2 – Esquema ilustrativo do ciclo biológico do SARS-CoV-2.....	14
Figura 3 – Representação esquemática da infecção pulmonar causada por <i>Betacoronavirus</i> e suas consequências imunológicas.....	16
Figura 4 – Principais semelhanças da patogênese do vírus da hepatite murina (MHV) com o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2)	19
Figura 5 – Esquema do processo de ubiquitinação.....	20
Figura 6 – Principais famílias de E3 ubiquitina-ligases.....	21
Figura 7 – Composição estrutural das E3s ubiquitina-ligases da subfamília NEDD4 (HECT).....	22
Figura 8 – Papel da ubiquitinação nas vias de sinalização para a produção de IFN e respostas antivirais.....	23
Figura 9 – Estrutura molecular de Smurf1 e seus domínios funcionais.....	25
Figura 10 – Substratos de Smurf1 na reposta imune inata e resistência do hospedeiro.....	27
Figura 11 – Smurf1 regula a síntese de CXCL1 sem afetar a liberação de vírus em macrófagos infectados por MHV-3.....	38
Figura 12 – Smurf1 não influencia na resistência do hospedeiro contra a infecção por MHV-3.....	40
Figura 13 – Smurf1 impacta na contagem de células hematológicas em camundongos infectados com MHV-3.....	42
Figura 14 – Smurf1 não influencia os títulos virais nem as alterações histopatológicas no pulmão e fígado de camundongos infectados com MHV-3.....	44
Figura 15 – A infecção por MHV-3 não altera a produção dos mediadores inflamatórios intrapulmonar de camundongos infectados com MHV-3.....	46
Figura 16 – Smurf1 modula a síntese de mediadores pró-inflamatórios, liberação de vírus e viabilidade celular em macrófagos infectados por MHV-A59.....	49
Figura 17 – Smurf1 contribui para a resistência do hospedeiro e para depuração viral durante a infecção por MHV-A59.....	51
Figura 18 – Smurf1 regula a inflamação sistêmica em camundongos infectados com MHV-A59.....	53
Figura 19 – Smurf1 regula a resposta antiviral sem alterar o dano histopatológico pulmonar em camundongos infectados com MHV-A59.....	55
Figura 20 – infecção por MHV-A59 não altera a produção dos mediadores inflamatórios intrapulmonar de camundongos infectados com MHV-A59.....	57
Figura 21 – Smurf1 regula o perfil inflamatório em macrófagos e neutrófilos no pulmão de camundongos infectados com MHV-A59.....	59
Figura 22 – Smurf1 é crucial para integridade do tecido hepático em camundongos infectados com MHV-A59.....	61
Figura 23 – Smurf1 não altera da expressão dos mediadores pró-inflamatórios hepáticos durante a infecção por MHV-A59.....	63
Figura 24 – Smurf1 regula o perfil inflamatório de macrófagos e neutrófilos no fígado de camundongos infectados com MHV-A59.....	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Classificação do SARS-CoV-2 e outros coronavírus	11
1.2. Estrutura dos <i>Betacoronavirus</i>	12
1.3. Ciclo biológico dos <i>Betacoronavirus</i>	13
1.4. Resposta imune inata e resistência aos <i>Betacoronavirus</i>	14
1.5. Coronavírus murino como modelo experimental	17
1.5. Ubiquitinação e ubiquitina-ligases.....	20
1.6. Papel da ubiquitinação na sinalização da resposta inflamatória durante as infecções virais.....	22
1.7. Smurf1 e resistência antimicrobiana	25
2. OBJETIVO	30
3.1 <i>Objetivo geral</i>	30
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Linhagem celular e vírus.....	31
3.2. Animais e aspectos éticos	31
3.3. Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea e infecção viral	31
3.4. Infecção dos camundongos e coleta de amostras.....	32
3.5. Análise da sobrevivência e escore clínico	32
3.6. Avaliação dos parâmetros hematológicos	33
3.7. Quantificação do título viral	33
3.8. Avaliação histopatológica.....	33
3.9. Análise enzimática.....	34
3.10. Quantificação dos mediadores inflamatórios.....	34
3.11. Ensaio de citometria de fluxo	34
3.12. RT-qPCR	35
4. RESULTADOS	37
4.1. Avaliação de mediadores inflamatórios e título viral em BMDMs Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-3.....	37
4.2. Análise da sobrevivência, massa corporal e escore clínico de camundongos Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-3.....	39
4.3. Parâmetros hematológicos de camundongos Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-3.....	41

4.4. Análise dos títulos virais e histopatologia de pulmão e fígado de camundongos Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-3.....	43
4.5. Produção de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-3.....	45
4.6. Avaliação de mediadores inflamatórios, título viral e viabilidade celular em BMDMs Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-A59	47
4.7. Análise da sobrevivência, massa corporal e títulos virais de camundongos Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-A59	50
4.8. Parâmetros hematológicos de camundongos Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-A59	52
4.9. Avaliação da expressão de marcadores inflamatórios e dano histopatológico no pulmão de camundongos Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-A59	54
4.10. Produção de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-A59.....	56
4.11. Avaliação do perfil celular e inflamatório de macrófagos e neutrófilos pulmonares em camundongos Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-A59	58
4.12. Avaliação da expressão de <i>Smurf1</i> , dano histopatológico e marcadores enzimáticos no fígado de camundongos Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-A59	60
4.13. Expressão de mediadores inflamatórios no fígado de camundongos Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-A59.....	62
4.14. Avaliação do perfil celular e inflamatório de macrófagos e neutrófilos hepáticos de camundongos Wild-type ou <i>Smurf1</i> ^{-/-} infectados com MHV-A59	64
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÃO	72
7. REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	82

1. INTRODUÇÃO

A pandemia da doença do coronavírus de 2019 (COVID-19), causada pelo vírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), ainda tem levado a mortalidade, morbidade, problemas socioeconômicos e psicológicos globais bastante significativos (DONG; DU; GARDNER, 2020; LONG et al., 2022; PAROTTO et al., 2023; YAO et al., 2024). Já foram notificadas mais de 6 milhões de mortes em todo mundo e somente no Brasil, mais de 700 mil óbitos em decorrência da COVID-19 (WHO, 2024). Os casos graves de infecções por coronavírus estão correlacionados com a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), que pode acarretar na falência múltipla dos órgãos, levando o indivíduo à morte (MATTHAY; WARE; ZIMMERMAN, 2012). Desde o início da pandemia, pesquisadores do mundo todo têm buscado entender os mecanismos imunopatológicos associados às manifestações clínicas e imunopatológicas ocasionadas pelo SARS-CoV-2 (HUANG et al., 2020) através de análises de amostras de pacientes infectados ou utilizando uma diversidade de modelos experimentais, o que tem acelerado o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (KIM; LEE; JU, 2021).

1.1. Classificação do SARS-CoV-2 e outros coronavírus

O SARS-CoV-2 pertence à família Coronaviridae que é composta por duas subfamílias, Letovirinae e Orthocoronavirinae. A subfamília Orthocoronavirinae é composta por quatro gêneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (Körner et al., 2020). O SARS-CoV-2 está inserido no gênero *Betacoronavirus*, onde outros vírus de importância médica e veterinária já são conhecidos como o coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) e o Vírus da Hepatite Murino (MHV) (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020).

Alguns coronavírus são patógenos comuns de humanos e animais, como porcos, bovinos, camelos, gatos, cães, roedores, pássaros e morcegos. Quatro coronavírus são endêmicos em humanos (coronavírus humano NL63 (HCoV-NL63), HCoV-229E, HCoV-OC43 e HCoV-HKU1) e normalmente infectam o trato respiratório superior, causando a SDRA, sintoma comum da infecção por coronavírus (Lamers et al., 2022). Nos últimos anos, alguns coronavírus de origem zoonótica têm transbordado de reservatórios animais para humanos, causando endemias e pandemias de nível global, sendo os agentes etiológicos o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), o coronavírus da síndrome respiratória

aguda grave (SARS-CoV) e o mais recente, o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) (WU et al., 2020a).

1.2. Estrutura dos *Betacoronavirus*

Os *Betacoronavirus* são vírus envelopados que possuem em seu interior um RNA de fita simples de sentido positivo, que varia entre 25-31 kb de tamanho a depender da estrutura viral. Seu genoma pode codificar proteínas estruturais (acessórias): *spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), dos quais a proteínas S medeia a entrada do vírus nas células hospedeiras; e proteínas não-estruturais (nsp 1-16/20), que pode variar também de acordo com o tamanho do vírus (Fig. 1) (CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES., 2020).

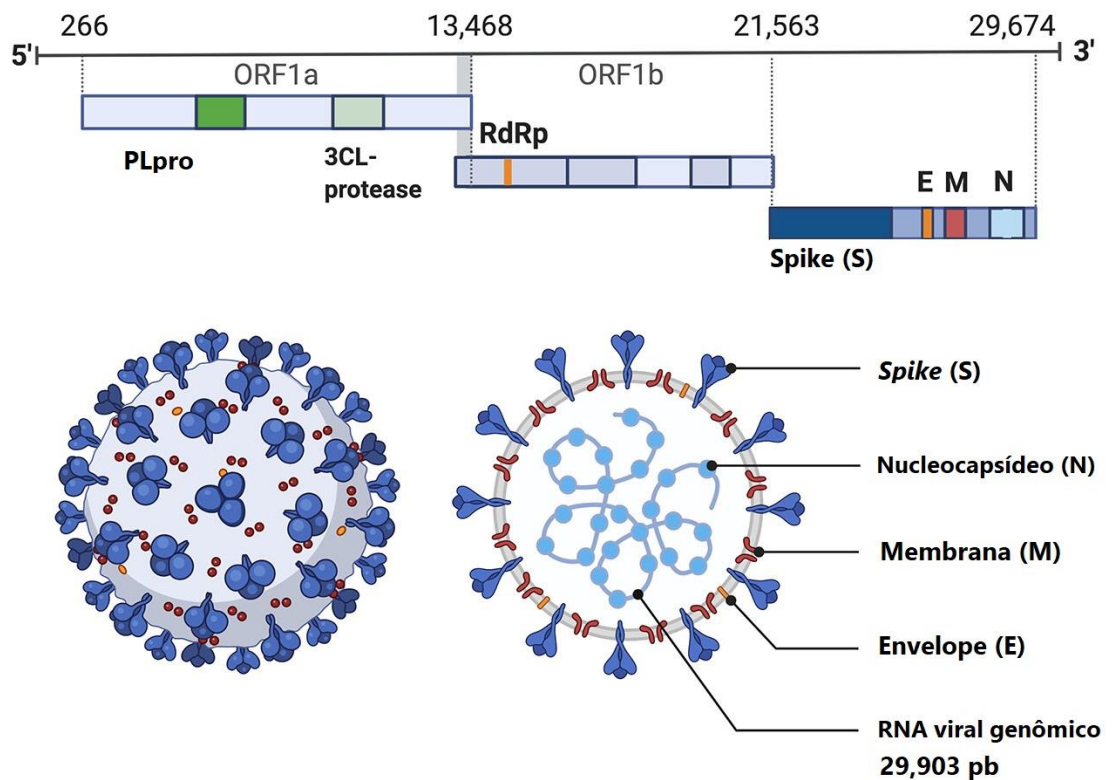


Figura 1. Representação esquemática da estrutura viral dos vírus pertencentes ao gênero *Betacoronavirus*. A ilustração destaca os principais componentes estruturais, incluindo a proteína **Spike (S)**, responsável pela entrada viral na célula hospedeira; a proteína **nucleocapsídeo (N)**, envolvida na compactação e proteção do RNA genômico; a proteína de **membrana (M)**, essencial para a montagem e integridade estrutural do vírus; a proteína de **envelope (E)**, que participa no processo de brotamento e liberação viral; e o **RNA genômico**, que contém as informações genéticas necessárias para a replicação e expressão viral. Adaptado de (RANDO et al., 2021).

1.3. Ciclo biológico dos *Betacoronavirus*

Antes da pandemia da COVID-19, pouco se sabia sobre o ciclo biológico dos coronavírus, pois muitos utilizam diferentes formas de entrada na célula hospedeira (CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES., 2020). Desde o início da pandemia, inúmeros esforços têm sido direcionados para caracterizar o ciclo biológico e a síntese das proteínas estruturais do SARS-CoV-2, com base em estudos prévios de outros vírus do gênero *Betacoronavirus*. As informações apresentadas neste trabalho foram elaboradas a partir de achados específicos do SARS-CoV-2, mas também podem ser correlacionadas com os mecanismos de replicação de outros membros pertencentes aos *Betacoronavirus*.

A entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira é mediada pela interação da proteína Spike (S) com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), facilitando a adesão viral. Paralelamente, a ativação da serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2) promove a clivagem da proteína S, desencadeando a fusão das membranas viral e celular. Após a entrada, o RNA genômico (gRNA) viral é traduzido a partir das regiões abertas de leitura (ORF1a e ORF1b). Durante esse processo, proteases incorporadas nas proteínas não estruturais (nsp3 e nsp5) clivam as poliproteínas traduzidas (pp1a e pp1ab), formando um complexo de replicação e transcrição (RTC) composto por 16 proteínas não estruturais. A replicação do RNA viral ocorre em compartimentos membranosos de dupla camada, criando um microambiente protegido contra a detecção pelo sistema imunológico. O RTC sintetiza tanto novos gRNAs quanto mRNAs subgenômicos (sg-mRNAs), os quais contêm regiões abertas de leitura (ORFs 2-9b) responsáveis por codificar proteínas estruturais, como Spike (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N), além de proteínas acessórias. Após a síntese, o gRNA recém-produzido pode ser utilizado como molde para a replicação adicional ou ser empacotado em novos vírions. Durante a montagem viral, as proteínas estruturais são translocadas para o retículo endoplasmático (ER) e processadas no compartimento intermediário ER-Golgi (ERGIC). Nesse local, os nucleocapsídeos, formados pelo revestimento do gRNA com proteínas N, interagem com as proteínas estruturais e brotam no ERGIC antes de serem liberados da célula hospedeira por meio de exocitose lisossomal (Fig. 2) (MALONE et al., 2022; V'KOVSKI et al., 2021).

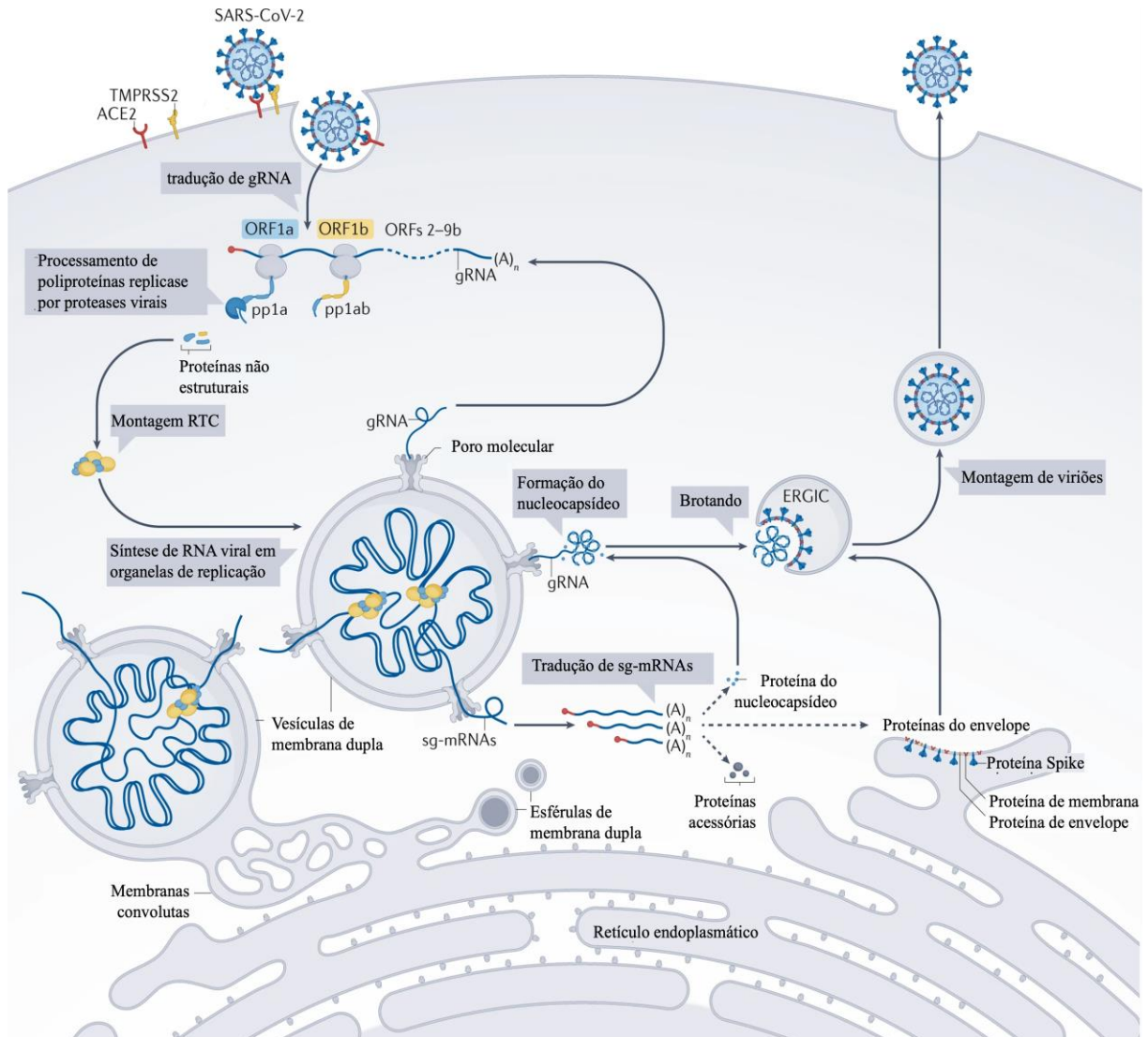


Figura 2. Esquema ilustrativo do ciclo biológico do SARS-CoV-2. A entrada do vírus na célula hospedeira ocorre por meio da interação da proteína *Spike* (S) com o receptor ACE2, seguida pela clivagem da TMPRSS2, ativando a fusão de membranas. Após a internalização, o RNA genômico (gRNA) é liberado e traduzido em poliproteínas (pp1a e pp1ab), que são processadas por proteases virais (nsp3 e nsp5) para formar um complexo de replicação e transcrição (RTC). Nesse microambiente protegido por membranas, ocorre a síntese de novos gRNAs e mRNAs subgenômicos (sg-mRNAs), responsáveis pela produção das proteínas estruturais e acessórias. Durante a montagem, os gRNAs são revestidos por proteínas N, formando nucleocapsídeos, que interagem com proteínas estruturais no compartimento ER-Golgi (ERGIC) antes de serem liberados por exocitose. Adaptado de (MALONE et al., 2022).

1.4. Resposta imune inata e resistência aos *Betacoronavirus*

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa ativada contra as infecções causadas por *Betacoronavirus*. Receptores de reconhecimento padrão (PRRs) semelhantes aos genes induzíveis por ácido retinóico (RIG-I e MDA5), do tipo Toll (TLRs), dentre outros, podem reconhecer componentes virais e induzir uma resposta imune antiviral (OKAMOTO et al., 2017). A ativação de receptores do tipo RIG-I e TLRs desencadeia uma cascata de sinalização que culmina na fosforilação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF-κB) e

membros da família dos fatores reguladores de interferon (IRFs). Essa ativação resulta na produção de interferons do tipo I (IFN-I), que, por sua vez, regulam a expressão de diversos genes estimulados por interferon (ISGs) e citocinas pró-inflamatórias. Essas moléculas atuam de forma parácrina ou autócrina, promovendo um estado antiviral nas células adjacentes e na própria célula que recebeu o estímulo inicial (SETH; SUN; CHEN, 2006).

Durante a resposta antiviral do hospedeiro, diversos mediadores inflamatórios são secretados para promover o recrutamento de células imunológicas ao local da infecção e/ou suprimir a replicação viral. Entre os principais mediadores induzidos pela infecção destacam-se os interferons do tipo I e III. Além disso, são produzidos outros mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas IL-1, IL-6, IL-18 e IL-8, bem como quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1/2, CXCL8, CXCL9 e CXCL10. (Fig. 3) (ANDRADE et al., 2021; LAMERS; HAAGMANS, 2022; ZHAO et al., 2022). Em conjunto, essas citocinas e quimiocinas induzem mecanismos antivirais na célula-alvo e potencializam a resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022; LAMERS; HAAGMANS, 2022). O aumento excessivo de mediadores inflamatórios pode estar associado ao aumento dos danos teciduais. Essa resposta inflamatória pode ser mediada pela ativação de vias de morte celular, como piroptose, apoptose e necroptose, mecanismo esse chamado de PANoptose. Esses eventos contribuem significativamente para a progressão da doença a um estado clínico crítico em pacientes (KARKI et al., 2021, 2022; ZHAO et al., 2022).

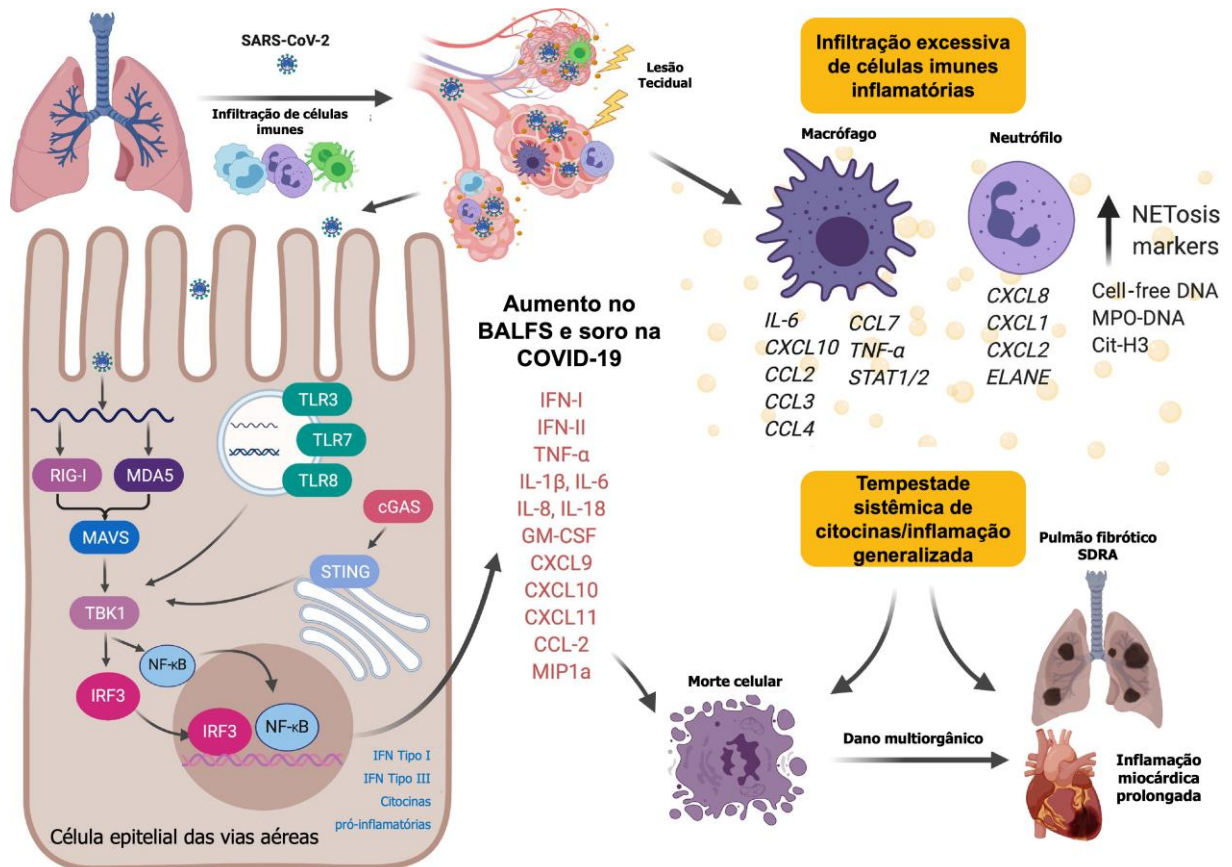


Figura 3. Representação esquemática da infecção pulmonar causada por *Betacoronavirus* e suas consequências imunológicas. Após a inalação, o vírus atinge o trato respiratório inferior, infectando células epiteliais alveolares, endoteliais e macrófagos. O reconhecimento pelo sistema imune inato, por meio de sensores citosólicos e receptores TLRs, induz a produção de interferons tipo I/III (IFNs) mediadores pró-inflamatórios. A resposta inflamatória exacerba o dano tecidual, promovendo disfunção endotelial, vazamento vascular e edema pulmonar, resultando em hipoxemia e insuficiência respiratória. O acúmulo de macrófagos e neutrófilos agrava a destruição tecidual, induzindo danos irreversíveis ao pulmão. Adaptado de (HARRISON; LIN; WANG, 2020).

A produção desses mediadores pró-inflamatórios leva ao recrutamento de diversos tipos de celulares para o local infeccioso e as primeiras células a chegarem no local são os macrófagos e os neutrófilos. Os macrófagos e neutrófilos desempenham papéis fundamentais na resposta imune contra os *Betacoronavirus*, influenciando tanto a defesa contra o vírus quanto a gravidade da doença (WANG et al., 2023). Nos pulmões os neutrófilos são capazes de liberar as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) para conter a infecção por *Betacoronavirus*. Essas NETs, durante a SDRA, podem contribuir para a morte de células epiteliais, aumentando ainda mais o processo inflamatório e dano tecidual (BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016). Os neutrófilos ativados podem interagir com plaquetas e células endoteliais, favorecendo a formação de coágulos sanguíneos induzindo a uma resposta inflamatória exacerbada, uma complicação comum em pacientes graves de COVID-19 (MIESBACH; MAKRIS, 2020). Os macrófagos são a primeira linha de defesa contra a infecção por *Betacoronavirus* (ZHENG et al., 2021). Durante a infecção inicial pelo SARS-CoV-2, foi

mostrado que a expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-6, além da quimiocina CXCL10, estava aumentada em macrófagos derivados de monócito humano, indicando uma intensa resposta pró-inflamatória mediadas por essas células (ZHENG et al., 2021). Essa atividade aumentada dos macrófagos induzir a diminuição da replicação e disseminação do vírus (THEOBALD et al., 2021). Além disso, partículas semelhantes ao SARS-CoV-2 (VLPs) estimularam a maturação de células dendríticas, que elevam a expressão de moléculas de superfície como CD80, CD86 e MHC-II presentes em macrófagos, além da produção de citocinas inflamatórias (MI et al., 2022). Isso indica que tanto macrófagos quanto neutrófilos desempenham um papel fundamental no controle da resposta inflamatória e podem estar envolvidos na exacerbação da inflamação e no dano tecidual em casos graves de COVID-19.

Dessa forma, considerando que os mecanismos que regulam a resposta inflamatória durante a infecção por *Betacoronavirus* ainda não são completamente compreendidos, é essencial aprofundar as investigações nesse campo. Estudos adicionais são necessários para elucidar com mais detalhes os processos imunológicos envolvidas na infecção por esses vírus. Esse conhecimento poderá contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas mais eficazes, visando não apenas conter a replicação viral, mas também modular a resposta inflamatória de forma equilibrada, prevenindo complicações associadas à infecção por *Betacoronavirus*.

1.5. Coronavírus murino como modelo experimental

Devido à alta patogenicidade e fácil transmissibilidade do SARS-CoV-2, além da necessidade de laboratórios de biossegurança de nível 3 ou 4 (NB3/4) para seu estudo, muitos pesquisadores têm utilizado outros *Betacoronavirus* mais seguros para compreender os mecanismos imunopatológicos, uma vez que a resposta imune possui alguns aspectos similares entre os vírus do mesmo gênero (CHAN et al., 2020; KÖRNER et al., 2020; LUTZ et al., 2020).

O vírus da hepatite murina (MHV) é amplamente utilizado como modelo experimental em estudos que buscam mimetizar as manifestações clínicas da infecção por SARS-CoV-2. Essa escolha deve-se à similaridade dos mecanismos fisiopatológicos, ao menor custo operacional e à facilidade de manipulação em laboratórios de biossegurança nível 2 (NB2). O MHV, um patógeno natural de camundongos (*Mus musculus*), possui um genoma de RNA de fita simples com polaridade positiva, além de codificar proteínas estruturais e não estruturais semelhantes aos outros vírus da família Coronaviridae (Fig. 4) (ANDRADE et al., 2021; KÖRNER et al., 2020). O MHV é um coronavírus que abrange diversas cepas, dentre elas

destacam-se os MHV-JHM (MHV-4), MHV-1, MHV-2 (MHV-Pr), MHV-3, MHV-A59 e MHV-S, por apresentarem um tropismo pelo trato respiratório (BARTHOLD; SMITH, 2007).

Diferentemente da entrada do SARS-CoV-2 em células humanas que utiliza a ECA2, o MHV usa como porta de entrada na célula murina a molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 1 (CEACAM1) (HIRAI et al., 2010). Apesar destes vírus utilizarem diferentes receptores para adentrar a célula hospedeira, o processo infeccioso é similar. A replicação do MHV ocorre principalmente no epitélio nasal e trato respiratório, no entanto, pode afetar outros órgãos como fígado, cérebro, rim, baço e órgãos reprodutivos (KÖRNER et al., 2020).

O processo imunopatológico de ambas as infecções também convergem na produção de mediadores inflamatórios. A infecção por MHV, assim como o SARS-CoV-2, estimula a produção de citocinas como TNF, IL-10, IL-6, IL-8, IL-1 β e quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10; o que leva a ativação de CD4⁺ e CD8⁺, caracterizando o processo inflamatório exacerbado da doença (ANDRADE et al., 2021; DIAMOND; KANNEGANTI, 2022; HARING, 2001; VABRET et al., 2020; ZHAO et al., 2022). Além disso, esses *Betacoronavirus* utilizam de mecanismo de evasão para inibir a resposta de IFN do tipo I do hospedeiro, o que favorece o estabelecimento da infecção (GU; JAN FADA, 2020; KARKI et al., 2022; LI et al., 2022; WANG et al., 2011).

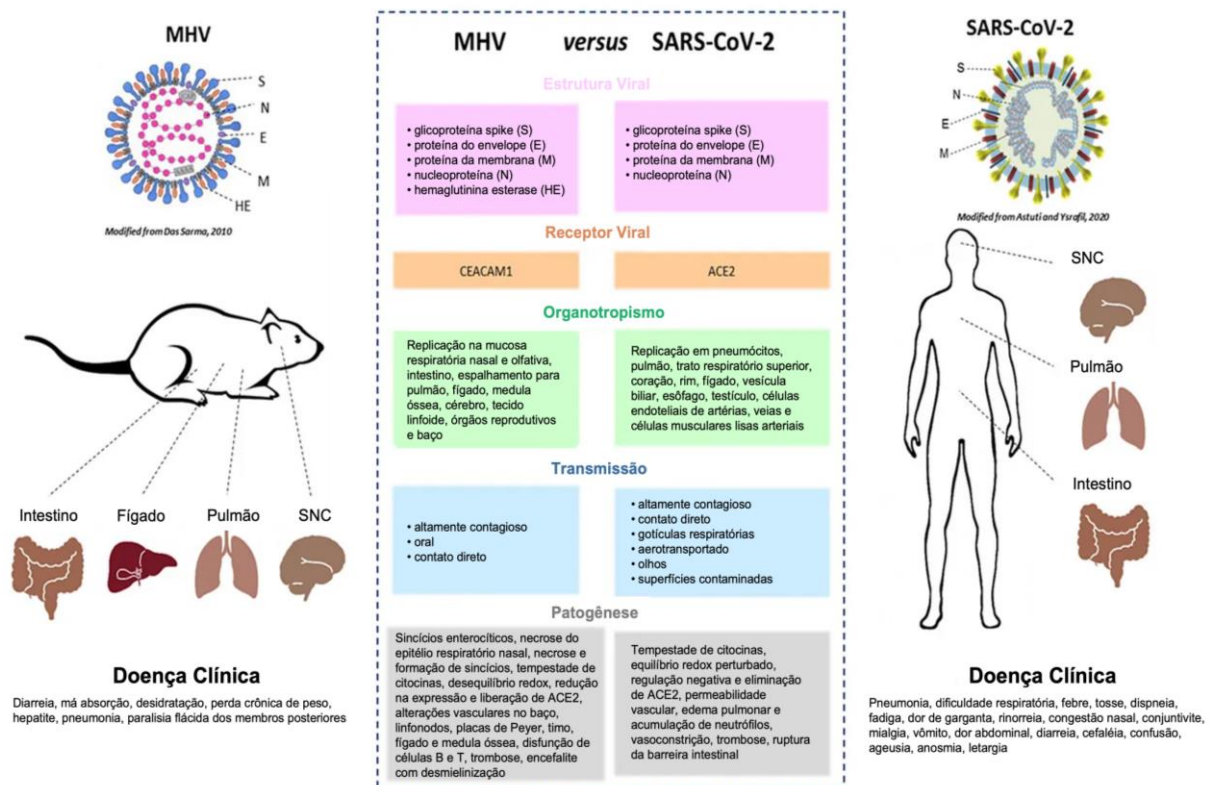


Figura 4. Principais semelhanças da patogênese do vírus da hepatite murina (MHV) com o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Adaptado de (KÖRNER et al., 2020)

A escolha da linhagem viral do MHV para estudo translacional com SARS-CoV-2 depende de diversos fatores com o tropismo e patogênese. Nesse estudo utilizaremos o MHV-3 e o MHV-A59 por conta dos seguintes fatores: I) o MHV-3 mimetiza um quadro de infecção grave da infecção por SARS-CoV-2 (ANDRADE et al., 2021), II) o MHV-A59 mostrou ter um aspecto mais leve a moderado da COVID-19 (PIMENTA et al., 2024). O MHV-A59 possui um organotropismo principalmente pelo pulmão, aumentando marcadores importantes da inflamação como TNF, IL-6, IP-10, IL-1 β , IFN- β e IFN- γ , mas sem acarretar morte (PIMENTA et al., 2024; YANG et al., 2014). Por outro lado, um estudo recente mostrou que MHV-3 acarreta diversas manifestações clínicas severas, similares aos achados na COVID-19 grave, com aumento de vários mediadores inflamatórios, aumento da viremia e a disseminação do vírus por diversos órgãos (ANDRADE et al., 2021). Um estudo avaliando papel do TLR2 na patogênese do MHV-3 e MHV-A59 mostrou que a infecção por MHV-3 é extremamente mais virulenta, letal e a produção de marcadores inflamatórios como TNF, IFN- β , IL-6, CXCL1, CXCL-10 e CCL2, é muito mais rápida em comparação com a linhagem de MHV-A59 (BLEAU et al., 2016).

A comparação entre o MHV e o SARS-CoV-2 enfatiza o fato de que, embora o MHV possa fornecer algumas informações sobre a biologia viral do SARS-CoV-2, existem limitações

nesse modelo, por exemplo, em termos de entrada ou reconhecimento de vírus. Portanto, camundongos infectados com MHV podem oferecer informações limitadas a respeito da COVID-19, mas definitivamente um modelo substituto para entender, decifrar e, finalmente, usar os mecanismos patológicos e as características virais do SARS-CoV-2 como abordagens terapêuticas. Assim, utilizar o MHV como modelo que mimetize a infecção por SARS-CoV-2, tornou-se uma alternativa atrativa de baixo custo, de menor risco humanos e, principalmente, fácil manipulação para compreender os mecanismos imunológicos desempenhados pelos *Betacoronavirus*.

1.5. Ubiquitinação e ubiquitina-ligases

O processo de ubiquitinação é uma modificação enzimática reversível que consiste na ligação covalente da ubiquitina (Ub) a substratos. Esse processo é dependente da ativação sequencial de três classes de enzimas: E1, E2 e E3 (Fig. 5). A enzima ativadora de ubiquitina conhecida como enzima 1 (E1), ativa ubiquitina dependente de adenosina-trifosfato (ATP); depois essa Ub é transferida para uma enzima conjugadora de ubiquitina 2 (E2) que, com auxílio de uma ubiquitina-proteína ligase 3 (E3), transfere com alta especificidade a Ub a um substrato-alvo (HERSHKO et al., 1983; HERSHKO; CIECHANOVER, 1998).

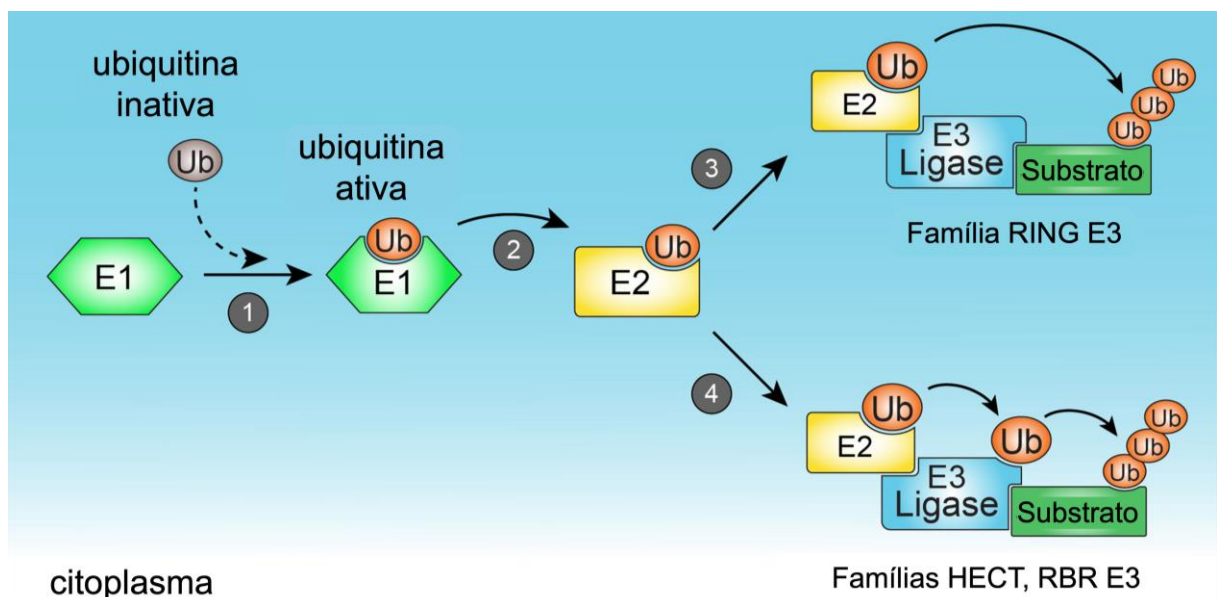


Figura 5. Esquema do processo de ubiquitinação. A ubiquitinação ocorre pela ativação sequencial de três classes de enzimas: a enzima ativadora de ubiquitina E1 (1), que ativa a ubiquitina citoplasmática; a enzima conjugadora de ubiquitina E2 (2), que recebe a ubiquitina ativada; e a ligase de ubiquitina E3, que facilita a transferência da ubiquitina para um resíduo de lisina no substrato. A transferência pode ocorrer de forma direta (3), por ligases do tipo RING E3, ou indireta (4), por ligases das famílias HECT e RBR E3. Adaptado de (SOUZA-COSTA et al., 2023).

As E3 ligases desempenham um papel crucial no processo de ubiquitinação, pois são elas que determinam a especificidade desse processo ao interagir com os substratos e transferir a Ub de forma altamente específica. Existem mais de 600 E3s ubiquitina-ligases no genoma humano identificadas e classificadas nas seguintes famílias de acordo com seu domínio: RING (*really interesting new gene*), HECTs (*homologous to the E6-AP carboxy terminus*) e RBR (*ring-IBR-ring ligase*) (Fig. 6) (DESHAIES; JOAZEIRO, 2009; ROTIN; KUMAR, 2009).

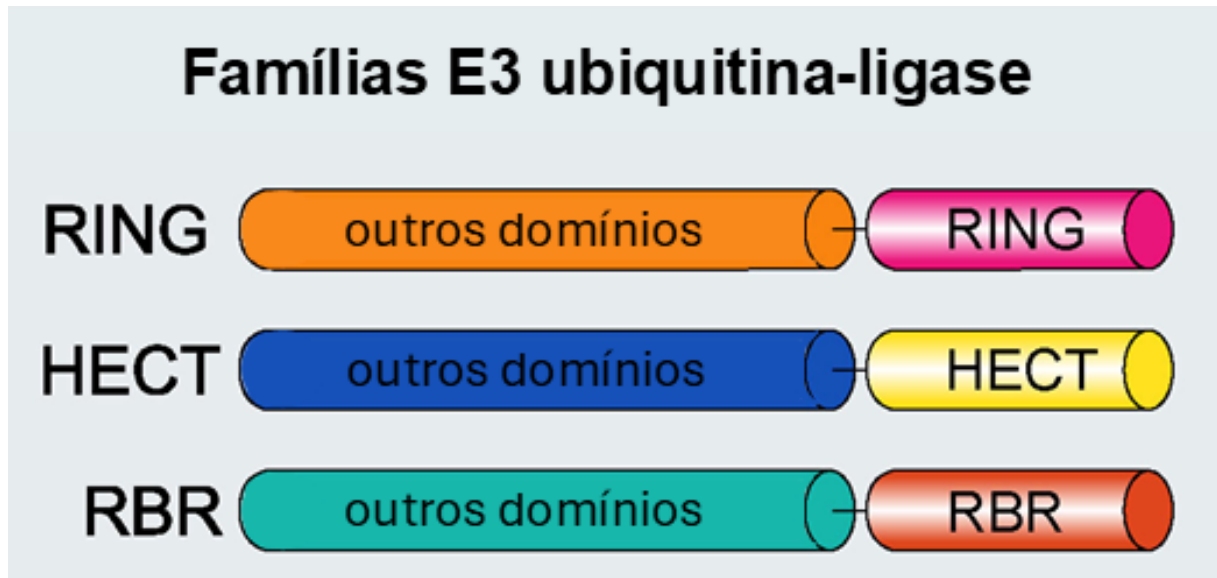


Figura 6. Principais famílias de E3 ubiquitina-ligases. O diagrama descreve as famílias RING, HECT e RBR e seus respectivos domínios funcionais. “Outros domínios” indicam domínios variáveis, específicos para cada família de E3 ligase. Adaptado de (SOUZA-COSTA et al., 2023)

O domínio HECT das E3 ubiquitina-ligases, composto por aproximadamente 350 aminoácidos, foi descrito pela primeira vez devido à sua associação constitutiva com a proteína E6 do vírus do papiloma humano (HPV) (HUIBREGTSE et al., 1995). As E3s ubiquitinas-ligases da família HECT são subdivididas em 3 subfamílias: a subfamília da NEDD4, HERC e outras pertencente à HECTs (ROTIN; KUMAR, 2009). Os membros da subfamília NEDD4, além do domínio catalítico HECT, contém outros domínios importantes para a função da proteína, como C2 e dois a quatro domínios WW (Fig. 7) (ROTIN; KUMAR, 2009).

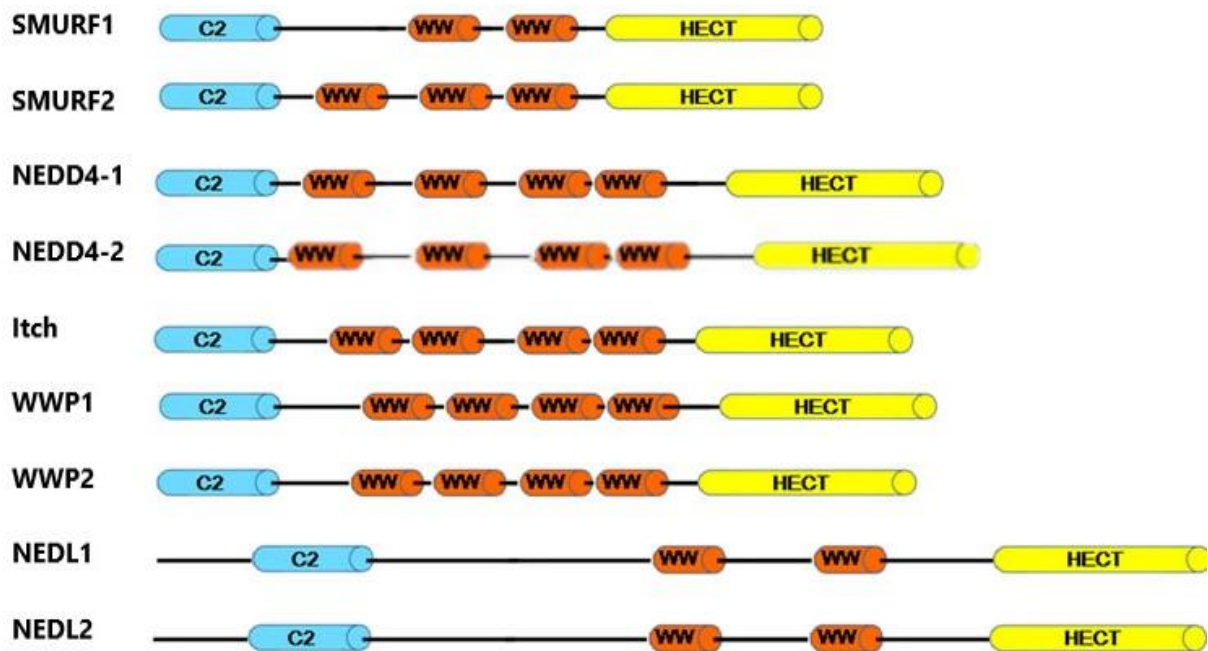


Figura 7. Composição estrutural das E3s ubiquitina-ligasas da subfamília NEDD4 (HECT). NEDD4 possui nove membros descrito com domínios C-terminal, WW e HECT. Adaptado de (CAO; ZHANG, 2013).

A proteína Ub contém sete resíduos de lisina: K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63. Os substratos podem ser modificados por monoubiquitinação, com a adição de uma única molécula de Ub, ou por poliubiquitinação, envolvendo múltiplas moléculas de Ub em cadeias. Essas cadeias apresentam diferentes conformações e desempenham funções celulares específicas. Entre elas, as cadeias poliubiquitinadas em K48 e K63 são as mais prevalentes. Cadeias K48 direcionam os substratos para degradação mediada pelo proteassoma, enquanto as cadeias K63 estão associadas à sinalização celular e à regulação 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, como a resposta inflamatória (AKUTSU; DIKIC; BREMM, 2016).

1.6. Papel da ubiquitinação na sinalização da resposta inflamatória durante as infecções virais

A ubiquitinação é um dos mecanismos centrais na regulação da inflamação, equilibrando a resposta imune para eliminar patógenos sem causar danos excessivos ao hospedeiro. A participação da ubiquitinação na ativação e controle de vias inflamatórias a torna um alvo promissor para o desenvolvimento de novas terapias contra doenças inflamatórias e infecções virais (Fig. 8) (GU; JAN FADA, 2020). Como mencionado anteriormente, quando

ocorre o reconhecimento dos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) pelos PRRs, uma cascata de sinalização de mediadores pró-inflamatória é ativada. Essa sinalização pode ser regulada por ubiquitinação, principalmente ligações do tipo K48 e K63 (GU; JAN FADA, 2020).

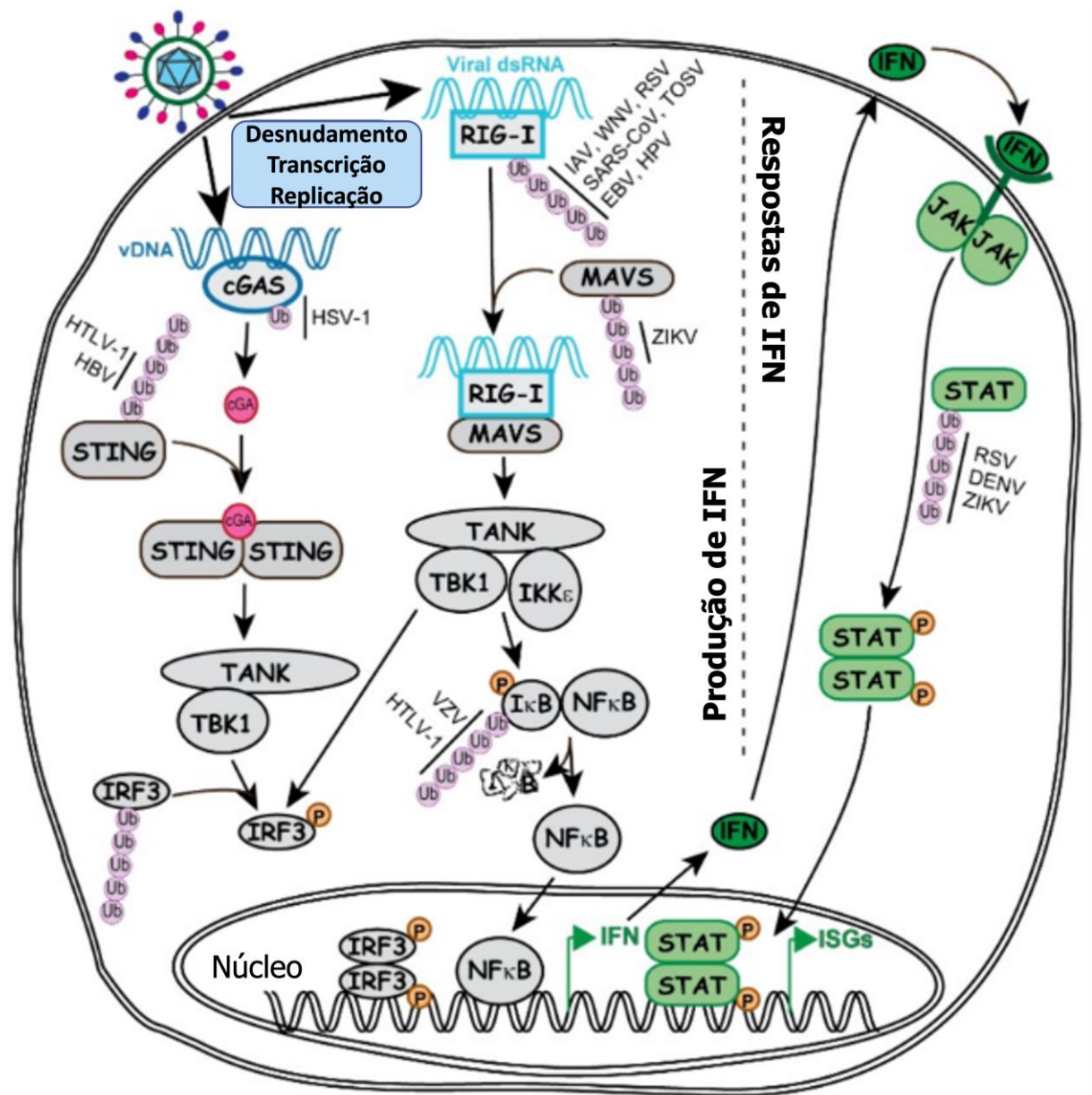


Figura 8. Papel da ubiquitinação nas vias de sinalização para a produção de IFN e respostas inflamatórias. A figura também mostra a atuação de vírus para manipular as vias de ubiquitinação para escape da resposta inflamatória do hospedeiro. À esquerda, a presença de vDNA (azul escuro) ou dsRNA viral (azul claro) é detectada pelos sensores cGAS e RIG-I, ativando a produção de IFN. À direita, o IFN secretado ativa a via JAK/STAT por sinalização autócrina ou parácrina, induzindo a expressão de ISG. Adaptado de (GU; JAN FADA, 2020).

A ubiquitinação tem um papel importante na regulação da resposta inflamatória durante a infecção viral no hospedeiro. No entanto, muitos vírus podem modular essa resposta como uma forma de escape desse controle fino dessa resposta inflamatória. O receptor da imunidade inata RIG-I possui um domínio CARD que pode sofrer poliubiquitinação do tipo K63, promovendo sua estabilidade na interação com o dsRNA viral e permitindo a ativação da via de sinalização do IFN do tipo I (GACK et al., 2007). No entanto, vírus como da influenza A, vírus do Nilo Ocidental (VNO) e vírus sincicial respiratório (VSR), expressam uma proteína chamada NS1 que interage com TRIM25, uma E3 ubiquitina-ligase, e inibe a ubiquitinação mediada por K63, levando a inativação da resposta de IFN do tipo I (BAN et al., 2018; RAJSBAUM et al., 2012; ZHANG et al., 2017).

Também foi mostrado que o SARS-CoV processa uma protease semelhante a papaína (PLP) que se assemelha a uma DUB e remove a cadeia de poliubiquitina de RIG-I induzindo uma diminuição da resposta antiviral (SUN et al., 2012). Recentemente, um estudo mostrou que a proteína M do SARS-CoV-2 degrada TBK1 via poliubiquitinação do tipo K48, levando a redução da resposta de IFN do tipo I, o que também leva a diminuição da resposta inflamatória (SUI et al., 2021).

A ativação da resposta inflamatória também depende do NF- κ B, na qual a poliubiquitinação dos tipos K48 e K63 desempenha um papel essencial na sua ativação e regulação. No entanto, assim como na via do IFN do tipo I, vírus de RNA podem estimular a expressão de mediadores pró-inflamatórios e modular a resposta inflamatória por meio dessa via (JIANG; CHEN, 2012). O vírus herpes simplex 1 (HSV-1) produz proteínas que atuam como E3 ligase, atuando na degradação dos componentes da via de NF- κ B, reduzindo a produção de mediadores inflamatórios importante para o recrutamento de novas células e controle da replicação viral (BOUTELL; SADIS; EVERETT, 2002). No contexto de coronavírus, a proteína PLP do SARS-CoV consegue remover diretamente a cadeia de poliubiquitina do tipo K63 das proteínas de sinalização TRAF3 e TRAF6, inibindo a translocação de NF- κ B e IRF3 para o núcleo (LI et al., 2016). Além disso, alguns vírus utilizam as E3ubiquitina-ligasas do hospedeiro como uma forma de modular a sinalização de NF- κ B, tal como a ORF-9b do SARS-CoV que usa a E3 ubiquitina-ligase AIP4 para desencadear a degradação de MAVS, TRAF3 e TRAF6 (SHI et al., 2014).

Os estudos vêm avançando nos últimos anos nesta área, mas ainda são necessárias mais investigações sobre quais ubiquitina-ligasas participam dos mecanismos imunológicos e, principalmente, como os vírus modulam essa resposta inflamatória para o seu próprio benefício.

A compreensão aprofundada dos mecanismos de ubiquitinação pode viabilizar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções virais.

1.7. Smurf1 e resistência antimicrobiana

O fator regulador de ubiquitinação Smad 1 (Smurf1) é uma E3 ubiquitina-ligase pertencente à subfamília de NEDD4 que catalisa a ubiquitinação de diversos substratos, para manter a estabilidade da resposta celular. Smurf1 já foi descrito em diversos contextos relacionados processos fisiológicos e distúrbios celulares, como formação óssea, diferenciação de osteoblastos, crescimento e migração celular, adesão e polaridade celular, desenvolvimento embrionário, autofagia seletiva, distúrbios do desenvolvimento embrionário e câncer (CAO; ZHANG, 2013; FRANCO et al., 2017; ORVEDAHL et al., 2011). Estruturalmente, Smurf1 contém um domínio HECT, dois domínios WW e um domínio C2 N-terminal (Fig. 9). 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) resulta na inativação de sua atividade ubiquitina-ligase (CHENG et al., 2011; WANG et al., 2014; YUAN et al., 2012a). Os domínios WW promovem a ligação de Smurf1 aos substratos e o domínio C2 é importante para mediar a interação de Smurf1 com membranas celulares ou com substratos (FEI et al., 2014; LU et al., 2011; SOUZA-COSTA et al., 2023).

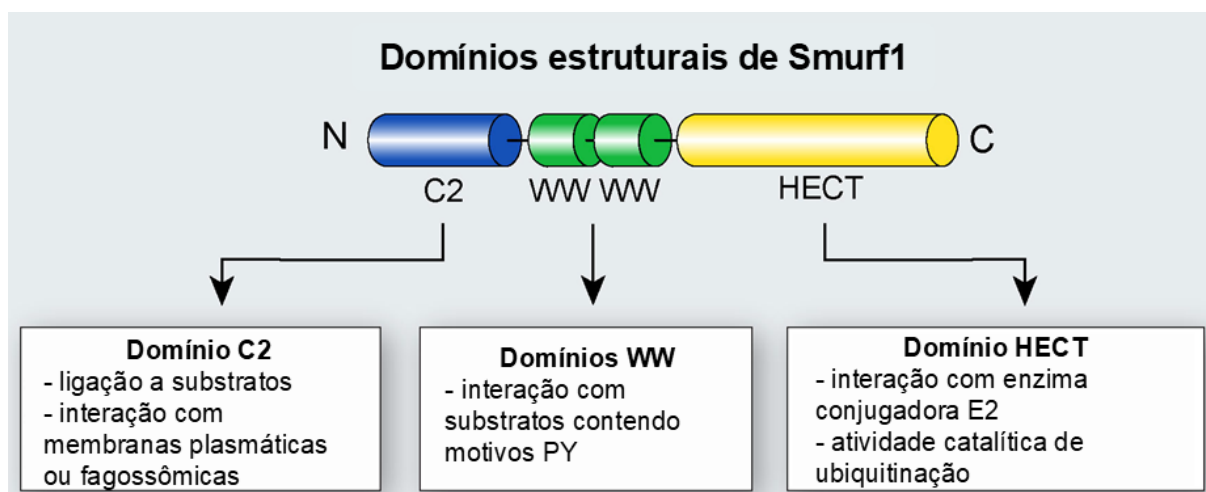


Figura 9. Estrutura molecular de Smurf1 e seus domínios funcionais. A proteína Smurf1 é composta por um domínio C2 na extremidade N-terminal, responsável pela ligação a membranas e lipídios, seguido por dois domínios WW, envolvidos na interação com proteínas contendo motivos de ligação a prolina. Na extremidade C-terminal, apresenta um domínio HECT, que atua como a região catalítica com atividade de E3 ligase-ubiquitina, promovendo a transferência de ubiquitina para substratos alvo. Adaptado de (SOUZA-COSTA et al., 2023)

Diversos estudos destacam o papel essencial de Smurf1 na ubiquitinação de substratos envolvidos na resposta inflamatória e na imunidade antimicrobiana (Fig. 10) (Souza-Costa et al., 2023). Entre os principais alvos estão proteínas da via de MyD88, proteínas da família dos

fatores associados ao receptor de TNF (TRAF) e da resposta antiviral. A via de sinalização dependente de MyD88 pode ser ativada pelos receptores *Toll-like*, desencadeando duas cascatas intracelulares (MAPK e via do NF- κ B). Essas vias ativam diferentes fatores de transcrição, que migram para o núcleo e regulam a expressão de genes envolvidos na resposta imune inata. (BROWN et al., 2011). Um estudo demonstrou que, na presença de lipopolissacarídeo (LPS), Smurf1 promove a ubiquitinação de MyD88, direcionando-o para degradação proteassomal por meio de Smad6 como adaptador. Esse mecanismo permite que Smurf1 atue como um regulador negativo da sinalização de TLRs dependente de MyD88, modulando as respostas imunes (LEE et al., 2011). Em concordância com esses achados, estudos recentes demonstraram que Smurf1 promove a degradação de MyD88 por meio de poliubiquitinação do tipo K48 em células HEK293T infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*, resultando na inibição da resposta inflamatória (PENG; YUE; XIONG, 2022). Além disso, foi evidenciado que Smurf1 atua na secreção de IL-1 β mediada por ciclofilina A (CypA), modulando a resposta inflamatória durante e após o estímulo com LPS, indicando a regulação complexa e delicada da resposta inflamatória (YANG et al., 2022).

Na via dependente de MyD88, as quinases IRAK são ativadas por fosforilação e, em seguida, recrutam e ativam alguns receptores da família TRAF, essenciais para a sinalização da resposta inflamatória (KAWASAKI; KAWAI, 2014). Ensaios de ubiquitinação demonstraram que Smurf1 interage com TRAF4 e TRAF6, promovendo sua ubiquitinação e degradação de maneira dependente desse processo (LI et al., 2010; WANG et al., 2013). TRAF4 é reconhecido como um regulador negativo da sinalização de NF- κ B, e a coexpressão de Smurf1 com TRAF4 em células HEK293 promoveu a ativação de NF- κ B, o que possivelmente pode induzir ao um aumento da resposta inflamatória (WANG et al., 2013).

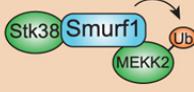
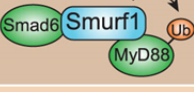
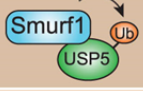
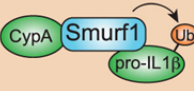
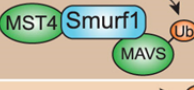
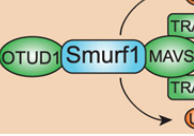
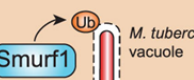
Smurf1 substratos/ligantes	Efeito da interação Smurf1-substrato na resposta imune
	Redução da ativação de ERK1/2, TNF e secreção de IL-6 por macrófagos primários deficientes para Stk38; Redução da expressão de IL-6, CXCL-2, CCL20 e redução da ativação de ERK1/2; Aumento da inflamação e letalidade em resposta à infecção por <i>E. coli</i> <i>in vivo</i> e alta suscetibilidade ao modelo de sepse por CLP em camundongos deficientes de Stk38
	Aumento da ativação de NF-κB em células da linhagem HEK293 que coexpressam Smurf1 e TRAF4
	Atividade reduzida de NF-κB em resposta ao tratamento com IL-1β ou TNF em células da linhagem HEK293 coexpressando Smurf1 e TRAF6
	Atividade reduzida de NF-κB em resposta ao tratamento com LPS em macrófagos peritoneais de camundongo
	Aumento da produção de citocinas por macrófagos primários de camundongo em resposta à infecção com BCG deficiente para PPE36; Aumento da resistência <i>in vivo</i> à infecção por uma cepa de <i>M. tuberculosis</i> deficiente para PPE36
	Redução da transcrição de TNF na linhagem celular humana tratada com shRNA para USP5; Aumento da transcrição de TNF na linhagem celular humana tratada com shRNA para Smurf1
	Aumento do processamento de pro-IL-1β dependente de K63; aumento da degradação de pro-IL-1β dependente de K48 em macrófagos primários de camundongos; Redução da lesão pulmonar em estágios iniciais, seguida por aumento da lesão pulmonar dependente de IL-1β em estágios finais da inflamação em camundongos deficientes em CypA tratados com LPS
	Aumento da transcrição de <i>Cxcl9</i> , <i>Cxcl10</i> , <i>Irf1</i> e <i>Nox2</i> em macrófagos peritoneais nocaute para Smurf1 e tratados com IFN-γ; Replicação viral prejudicada em macrófagos peritoneais com Smurf1 silenciado infectados com VSV
	Inibição da ativação mediada por MAVS de IFN-β, NF-κB e ISRE em resposta ao Poli (I:C), RNA da influenza e vírus Sendai em macrófagos primários de camundongo e linhagem celular humana HEK293
	Redução da ativação de IFN-β, IFIT1 e ISRE em resposta a transfecção com Poli (I:C) e à infecção vírus Sendai em células HEK293
	Aumento da transcrição de IFN tipo I, TNF e IL-6 em resposta à infecção por vírus de RNA em fibroblastos embrionários de camundongo (MEF) deficientes em OTUD1; Alta produção de citocinas antivirais e maior resistência à infecção por vírus de RNA em camundongos deficientes em OTUD1
	Aumento da replicação do VSV em células HEK293 com superexpressão de Smurf1
	Aumento dos níveis de cápside intracelular do vírus Sindbis em MEFs deficientes de Smurf1 e em células HeLa reduz a expressão de Smurf1
	Não avaliada
	Eliminação autofágica dependente de ubiquitina de <i>M. tuberculosis</i> em macrófagos primários de camundongos e humanos; Alta expressão de Smurf1 em biópsias pulmonares humanas de pacientes com tuberculose; Aumento da resistência à tuberculose em um modelo experimental em camundongos

Figura 10. Substratos de Smurf1 envolvidos na resposta imune inata e resistência do hospedeiro. A figura apresenta os substratos, os ligantes de Smurf1, os efeitos na resposta imune e suscetibilidade à infecção. Adaptado de (SOUZA-COSTA et al., 2023)

Embora vários estudos evidenciem o papel de Smurf1 na regulação da resposta inflamatória, sua participação em infecções virais ainda permanece pouco elucidada. O primeiro estudo a investigar o mecanismo de ação de Smurf1 destacou seu papel específico na virofagia. Este estudo *in vitro* mostrou que Smurf1 interage com a proteína capsídeo do vírus Sindbis e promove sua entrega aos autofagossomos para degradação (ORVEDAHL et al., 2011). Smurf1 pode não interagir diretamente com proteínas relacionadas a resposta antiviral, mas em outras moléculas que regulam essa resposta. A protease específica da ubiquitina 25 (USP25) é uma enzima de deubiquitinação presente na maioria dos tecidos humanos. Sua função inclui a remoção de ubiquitina de TRAF3 e TRAF6, contribuindo para a resistência do hospedeiro contra infecções por vírus de DNA e RNA (LIN et al., 2015; VALERO et al., 1999). Um estudo *in vitro* mostrou que Smurf1, durante a infecção pelo vírus da estomatite vesicular (VSV), promove a degradação do USP25 através do aumento da poliubiquitinação do tipo K48 e, assim, levando a uma diminuição da replicação viral mediada pela USP25 (QIAN et al., 2018).

Em relação a sinalização da resposta antiviral, alguns trabalhos tem relatado a participação de Smurf1 com um fator regulador importante para o ajuste fino dessa resposta. O transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT1) é uma importante proteína na amplificação do sinal de IFN e é conhecido como um componente crucial na via Jak/STAT (EZEONWUMELU; GARCIA-VIDAL; BALLANA, 2021). Foi mostrado que a degradação de STAT1 por Smurf1 via poliubiquitinação do tipo K48, bloqueia a sinalização de IFN- γ , levando a redução da atividade microbicida de macrófagos (YUAN et al., 2012b). A resposta de IFN do tipo I é a mais importante durante as infecções virais e Smurf1 parece ter um papel fundamental na resposta à infecção e a propagação viral. Isso foi demonstrado pela interação direta de Smurf1 com a proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS) que com o auxílio de outras proteínas, como proteína de interação da família Nedd4 I (Ndfip1), um recrutador e ativador de E3 ubiquitina-ligases NEDD4, promoveu a degradação de MAVS dependente de proteassoma, prejudicando a ativação de vários mecanismos antivirais em macrófagos primários de camundongo (MUND; PELHAM, 2009; WANG; TONG; YE, 2012).

Em relação à imunidade contra coronavírus, pouco ainda se sabe sobre o papel dessa ubiquitina-ligase no controle da resposta inflamatória. Apenas recentemente, foi demonstrado que Smurf1 pode apresentar um papel na imunidade contra coronavírus. O estudo de Novelli et al. (2021) em ensaio de imunoprecipitação de lisados de células HEK293T superexpressando Smurf1 e a proteína *Spike* (S), mostrou que a proteína S do SARS-CoV-2 interage fisicamente com Smurf1. Ainda neste estudo, quando eles foram avaliar a expressão das E3 ligases em

amostras de swabs da nasofaringe e orofaringe de pacientes grave de COVID-19, a expressão do mRNA para Smurf1 estava aumentada. No entanto, nenhum outro mecanismo foi avaliado pelos autores em relação a atividade de Smurf1 no contexto de resposta antiviral, o que indica que estudos adicionais precisam ser realizados para entender qual a participação dessa ubiquitina-ligase na infecção por coronavírus.

Uma resposta inflamatória bem regulada é essencial para a defesa do organismo contra infecções virais, garantindo a eliminação do patógeno sem causar danos excessivos ao hospedeiro. No entanto, a falta de um controle preciso desse processo pode resultar em uma inflamação descontrolada, contribuindo para lesões teciduais graves e até mesmo a morte do indivíduo. Nesse contexto, Smurf1 desempenha um papel fundamental na regulação de diversas vias de sinalização celular, incluindo aquelas envolvidas na resposta inflamatória e na imunidade antiviral. Considerando sua função reguladora, levantamos a hipótese de que Smurf1 pode desempenhar um papel central no controle da inflamação induzida por infecções por *Betacoronavirus*, contribuindo para um equilíbrio entre a resposta imune e a preservação da integridade tecidual do hospedeiro.

Dentro desse contexto, baseado nos dados até o momento publicados na literatura, este estudo propõe avaliar a importância de Smurf1 em regular a resposta inflamatória durante a infecção por coronavírus murino e determinar a participação dessa ubiquitina-ligase no controle fino da resposta inflamatória. Os dados obtidos neste estudo contribuirão para o entendimento dos mecanismos imunológicos desempenhados pelas ubiquitina-ligasas e na busca de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da COVID-19 e outras infecções causadas por *Betacoronavirus*.

2. OBJETIVO

3.1 *Objetivo geral*

Avaliar o papel da ubiquitina-ligase Smurf1 na imunopatologia durante a infecção por *Betacoronavirus* utilizando um modelo murino de infecção por MHV.

3.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar *in vitro* os mecanismos imunológicos desempenhados por Smurf1 durante a infecção por MHV-3 ou MHV-A59;
- Caracterizar a imunopatologia da infecção por MHV-3 ou MHV-A59 em camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} por meio da análise de sobrevida, escore clínico e parâmetros hematológicos;
- Estudar a importância de Smurf1 na resposta imune e controle da inflamação aguda durante a infecção por MHV-3 ou MHV-A59 em camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} por meio das análises histopatológicas, citometria de fluxo, quantificação de mediadores inflamatórios e do título viral.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagem celular e vírus

Células L929 (fibroblasto, ATCC ® CCL-1) foram cultivadas em atmosfera controlada (37° C, 5% de CO₂) em meio de cultura DMEM (Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com 7% de soro fetal bovino (FBS) (Biowest, Nuaillé, França), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NE, EUA). A cepa de MHV-3 foi gentilmente cedida e sequenciada (número de acesso do GenBank MW620427.1, (GARCIA et al., 2021), pela Dra. Clarice Arns e Dr. Ricardo Durães-Carvalho da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Brasil) e o MHV-A59 foi obtido da ATTC ® VR-764, ambos os vírus foram propagados em células L929. A propagação do vírus foi realizada de acordo com (ANDRADE et al., 2021)

3.2. Animais e aspectos éticos

Os procedimentos envolvendo animais de experimentação foram realizados com grupos mistos (machos ou fêmeas) de camundongos entre 6-8 semanas de idade e receberam a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (processo nº 190/2020 e 186/2022). Os camundongos C57BL/6 (Wild-type) e camundongos deficientes de Smurf1 (*Smurf1*^{-/-}) (YAMASHITA et al., 2005) foram alojados em gaiolas individualmente ventiladas colocadas em um biotério a 24±2 ° C em um ciclo de 12 horas (claro/escuro), recebendo acesso *ad libitum* a água e comida.

3.3. Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea e infecção viral

Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM, do inglês *bone marrow-derived macrophage*) foram gerados a partir da medula óssea de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} como relatado anteriormente (COLLINS et al., 2015; FRANCO et al., 2017). Camundongos foram anestesiados pela injeção via intraperitoneal (ip) com xilazina (10 mg/kg) e cloridato de cetamina (150 mg/kg). Os fêmures e tíbias, direita e esquerda, foram removidos, limpos e transferidos para tubos de 15 mL contendo solução salina estéril. Em seguida, a medula óssea foi coletada e as células obtidas foram cultivadas em meio condicionado por células L929 (LCCM). Após sete dias, os BMDMs foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços em triplicata (2 x 10⁵ células/poço) e infectados com MHV-3 ou MHV-A59 da seguinte forma: a partir de estoques congelados, a multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 PFU/célula em 100 µL de DMEM com 2% FBS foi adicionado ao poço. Após 1 hora de adsorção viral em estufa a

37°C e 5% CO₂, foi adicionado meio fresco, totalizando 500 µL por poço. Posteriormente, a placa foi incubada em a estufa a 37°C e 5% CO₂. Ao final de cada tempo, como descrito nas legendas das figuras, 50 µL do sobrenadante foi coletado e congelado a -80°C para quantificação dos títulos virais e o volume restante foi destinado para a quantificação de mediadores inflamatórios e lactato desidrogenase.

3.4. Infecção dos camundongos e coleta de amostras

Camundongos C57BL/6 ou *Smurf1*^{-/-} foram divididos em grupos de infectados ou não-infectados (mock) (n = 6 ou 8). Os camundongos foram previamente anestesiados com xilazina (5 mg/kg/ip) e cloridrato de cetamina (50 mg/kg/ip), e a infecção com MHV-3 foi realizada pela via intranasal com 30 µL do inóculo viral de 10² PFU (15 µL em cada narina) e eutanasiados por volta do 4º dia pós-infecção. Seguindo o mesmo protocolo descrito acima, a infecção com MHV-A59 foi realizada com inóculo de 10⁴ PFU e os camundongos foram eutanasiados em dias diferentes, conforme descrito nas legendas das figuras. Os camundongos foram eutanasiados com xilazina 10 mg/kg/ip e cloridrato de cetamina 150 mg/kg/ip e as amostras coletadas conforme descrito a seguir.

O sangue foi obtido por punção cardíaca e colocados em tubos revestidos com EDTA. Em seguida, o fígado e os pulmões foram colhidos, rapidamente enxaguados em PBS 1X frio (pH 7,4). O lobo direito do pulmão foi congelado até ser processado para a quantificação dos mediadores inflamatórios e titulação viral. Por outro lado, o lóbulo esquerdo foi fixado por imersão em solução de formalina tamponada a 4% para análise histopatológica. Fragmentos fixados em formalina e congelados de fígado, também foram processados para análises posteriores de histopatologia e quantificação de mediadores inflamatórios, respectivamente. O sangue total foi utilizado para análises hematológicas e após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 r.p.m. por 15 min e o plasma separado para quantificação enzimática.

3.5. Análise da sobrevida e escore clínico

Para as análises de sobrevida, camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} (n= 6 ou 7/grupo) foram infectados como descrito acima. Diferentes inóculos de MHV-3 foram utilizados para análise (10¹, 10² e 10³ PFU) (ANDRADE et al., 2021). A infecção pelo MHV-A59 foi realizando de maneira similar utilizando 10⁴ ou 10⁵ PFU (PIMENTA et al., 2024; YANG et al., 2014). Para o acompanhamento da sobrevida, os camundongos infectados foram eutanasiados ao perderem 20% da massa corporal inicial ou acompanhados até 11 dias pós-infecção. Os

camundongos que sobreviveram após 11 dias de infecção foram eutanasiados com a injeção de sobredose anestésica. Para a determinação do escore clínico da doença, durante o período de infecção, uma vez por dia, os animais foram avaliados quanto ao peso, atividade, postura, pelagem, respiração, alterações nos olhos e edema de face. Todos os animais receberam notas que variaram de 0 a 4 pontos conforme o estado clínico (SHRUM et al., 2014).

3.6. Avaliação dos parâmetros hematológicos

O sangue total dos camundongos foi destinado a contagem diferencial de leucócito total, linfócitos e granulócitos. A análise foi realizada pelo hemocitômetro Celltac MEK-6500K (Nihon Kohden, Tóquio, Japão) de acordo com as instruções do fabricante.

3.7. Quantificação do título viral

Para a quantificação dos títulos virais as amostras foram processadas da seguinte forma: o sobrenadante dos BMDMs congelados (50 μ L) foram ressuspensos em 450 μ L de DMEM com 2% de FBS e submetidos ao ensaio de placa. Já as amostras de pulmão e fígado foram homogeneizadas em DMEM com 2% de FBS (100 mg/mL) e submetidos ao ensaio de placa. Resumidamente, o ensaio de placa consistiu na diluição seriada de amostras para adsorção em monocamadas de células L929 preparadas previamente em placas de 24 poços (1 x 10⁵ célula/poço) e incubadas durante a noite para aderência. No dia seguinte, 100 μ L das amostras diluídas em série foram adicionados às monocamadas e agitados suavemente por 1h. As amostras foram removidas e substituídas por 1 mL de meio de sobreposição (DMEM com 1,5% *p/v* de carboximetilcelulose [Synth, SP, Brasil] e 2% de SFB), seguido de incubação a 37°C, 5% de CO₂ por 48h. Após a incubação, as células foram fixadas com formaldeído tamponado a 10%, lavadas e coradas com azul de metileno (Synth, SP, Brasil) 1% *p/v*. O título viral foi determinado pela contagem de PFUs, expresso como Log₁₀ PFU/mL para sobrenadante de BMDM ou Log₁₀ PFU/100 mg de tecido para amostras de tecido.

3.8. Avaliação histopatológica

Após 48 horas, o pulmão e o fígado fixados em formaldeído tamponado a 4% foram transferidos para etanol 70%. Os tecidos passaram pelo processo de desidratação em série crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%), clarificados em solução de Xilol (I e II) e embebidos em parafina (FFPE). Os blocos histológicos foram seccionados em fatias de 5 μ m de espessura, corados com hematoxilina-eosina (H&E) e examinados em microscopia de luz por um patologista do grupo (CMQJ) as cegas. A quantificação da lesão mediada por inflamação nos

pulmões dos camundongos foi realizada empregando um sistema de pontuação que abrange: (i) inflamação das vias aéreas (até 4 pontos); (ii) inflamação vascular (até 4 pontos); (iii) inflamação do parênquima (até 5 pontos); e infiltração neutrofílica geral (até 5 pontos). Para o fígado foi avaliado a presença de infiltrado inflamatório, dilatação de vaso, degeneração tecidual, necrose e hemorragia, levando em consideração os seguintes parâmetros: 0: ausente (0%); 1: mínimo (1-20%), 2: leve (21-40%); 3: moderado (41-60%); 4: acentuado (61-80%); 5: grave (81-100%) (HORVAT et al., 2007).

3.9. Análise enzimática

A atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT) e de aspartato aminotransferase (AST) foi realizada no soro dos camundongos infectados usando um teste cinético (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). Resumidamente, o ensaio enzimático foi realizado em placa de 96 poços, onde 20 µL do plasma puro foi adicionado em cada poço. Os substratos e coenzimas fornecidos e especificados no kit foram adicionados nas amostras e no intervalo de 1 min foi feito a leitura da placa (4 vezes) em um espectrofotômetro a 37°C a cada 1 min por 4 min com absorbância lida a 340 nm.

3.10. Quantificação dos mediadores inflamatórios

As amostras de pulmão foram processadas e para cada 100 mg de tecido, 1 mL de tampão de extração de citocinas foi adicionado (Tris 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1 mM, desoxicolato de sódio a 1%, 0,5% e coquetel inibidor de protease 1%), as concentrações dos mediadores inflamatórios nas amostras foram avaliadas por método do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) usando kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Foram quantificadas citocinas como: TNF, IL-6 e IL-1 β , CXCL1, CCL2 e CCL5.

3.11. Ensaio de citometria de fluxo

A imunofenotipagem de macrófagos e neutrófilos foi avaliada usando tecidos de pulmão e fígado perfundidos, processados e enriquecidos. O tecido hepático foi macerado com um filtro de células porosas de 70 µm (Corning, Tewksbury, MA, EUA), seguido por lise de eritrócitos e enriquecimento de leucócitos com um gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA). Os tecidos pulmonares foram cortados em pequenos pedaços, digeridos com colagenase

I (Gibco, Grand Island, NE, EUA) e passados por um filtro de células porosas de 70 μ m. As células isoladas de fígado e pulmão foram cultivadas por 4h em RPMI mais suplementos na presença de Brefeldina A (ThermoFisher). Para excluir células mortas, células viáveis foram coradas com um marcador de viabilidade (Acqua, Invitrogen, 1:1000). Para a coloração dos marcadores de superfícies extracelulares, foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD45 (PerCP-Cy5.5, MCD4505, ThermoFisher, 1:200); anti-CD11b (Super Bright, M1/70, ThermoFisher, 1:500); anti-F4/80 (APC, BM8, ThermoFisher, 1:200); anti-Gr-1 (Biotina, RB6-8C5, Biolegend, San Diego, CA, EUA, 1:500); anti-MHC Classe II (IA/IE) (APC-eFluor 780, M5/114.15.2, ThermoFisher, 1:400); Estreptavidina (Pacific Orange, ThermoFisher, 1:200). Para coloração intracelular, as células foram lavadas, fixadas, permeabilizadas com o conjunto de tampões Cytofix/Cytoperm (eBioscience, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e incubadas com os seguintes anticorpos: anti-TNF (PE, DY410, R&D System, McKinley Place, NM, EUA, 1:500); anti-iNOS (PE-eFluor610, CXNFT, ThermoFisher, 1:500); anti-IL-10 (AlexaFluor 700, JES5-16E3, ThermoFisher, 1:100). O equipamento da BD LSR-FORTESSA foi usado para aquisição, e os dados foram analisados usando singletos com uma porta FSC-A versus a porta FSC-H, com a exclusão de detritos e avaliação de bolhas. Os macrófagos foram selecionados em células vivas $CD45^+CD11b^+Gr-1^-F4/80^+$ e os neutrófilos foram selecionados em células vivas $CD45^+CD11b^+Gr-1^+F4/80^-$. O FlowJo V10.4.11 foi usado para análise de dados.

3.12. RT-qPCR

A determinação dos níveis de mRNA para IFN- β e Smurf1 no pulmão e TNF, IL-6, IFN- β e Smurf1 no fígado de camundongos infectados foi realizada por RT-qPCR utilizando primers específicos, respectivamente. Amostras de pulmão ou fígado dos animais infectados com MHV-A59 foram coletadas e armazenadas a -80°C até o momento da extração do RNA total. Posteriormente, o tecido foi pesado (~ 30 mg de tecido/amostra), homogeneizado e a extração do RNA foi realizada usando o Kit PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen). Após a extração, o RNA foi quantificado usando kit Qubit RNA High Sensitivity Assay (Invitrogen) e 500 ng de RNA/amostra foi normalizado para todas as amostras. Em seguida, o cDNA foi preparado através do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) e o RT-PCR para os genes alvos foi realizado utilizando PrimeTime qPCR primers e SYBR Green (Gotaq qPCR Master Mix – Promega), a partir de 2 μ L de cDNA. O ensaio foi realizado utilizando Biorad CFX Maestro (Biorad) e os resultados foram apresentados como unidades de expressão relativa após a normalização para o gene constitutivo HPRT: Sequências dos primers

utilizados: IFN- β : Primer 1: 5'-CCCCAAAATGGTTAAGGTTGC-3'; Primer 2: 5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCC-3'. Smurf1: Primer 1: 5'-CCAAATAGTGGTCAGTTTTACAG-3'; Primer 2: 5'-CAGTACCATCTGTATATGGGG. HPRT: Primer 1: 5'-CCCCAAAATGGTTAAGGTTGC-3'; Primer 2: 5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCC-3'; TNF: Primer 1: 5'-AGACCCTCACACTCAGATCA-3'; Primer 2: 5'-TCTTTGAGATCCATGCCGTTG-3'; IL-6: Primer 1: 5'-AGCCAGAGTCCTTCAGAGA-3'; Primer 2: 5'-TCCTTAGCCACTCCTTCTGT-3'.

3.13. Análise estatística

O programa estatístico GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad, San Diego, CA, USA) foi utilizado para determinar a significância estatística. O teste *t Student* não pareado bicaudal foi usado para comparações únicas e *two-way ANOVA* foi usada para comparações múltiplas, conforme as indicações nas legendas das figuras. O teste Log-rank (Mantel-Cox) foi usado para estudos de sobrevida. Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação de mediadores inflamatórios e título viral em BMDMs Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-3

Sabendo que *Smurf1* possui um papel regulatório na resposta inflamatória e a infecção por MHV-3 induz uma ativação da resposta inflamatória em macrófagos, inicialmente investigamos o papel de *Smurf1* em modular a resposta inflamatória em macrófagos durante a infecção por MHV-3. Para isso, utilizamos macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-}.

A análise dos mediadores inflamatórios revelou que a infecção por MHV-3 não induziu um aumento significativo nas citocinas IL-1 β (Fig. 11a) e quimiocinas CCL2 (Fig. 11b) mesmo na ausência de *Smurf1*. Em contraste, observamos que a infecção por MHV-3 induziu um aumento discreto na produção de CXCL1, quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos, em BMDMs *Smurf1*^{-/-}, mas não em BMDMs Wild-type, após 18 horas (Fig. 11c). Esse aumento persistiu ao longo do tempo, com um aumento significativo de CXCL1 em BMDMs Wild-type e *Smurf1*^{-/-} em comparação aos controles (Fig. 11c). No entanto, a diferença estatística entre esses dois grupos foi observada apenas após 48 horas (Fig. 11c). Isso sugere que a infecção por MHV-3 induz uma rápida produção de CXCL1 nos BMDMs *Smurf1*^{-/-}, indicando um possível papel modulador de *Smurf1* na síntese de CXCL1 em macrófagos infectados.

Além disso, para avaliarmos a participação de *Smurf1* na liberação de partículas virais infectivas, fizemos a quantificação dos títulos virais na cultura dos BMDMs infectados com MHV-3. Os resultados mostraram que a infecção por MHV-3 foi produtiva, mas a ausência de *Smurf1* não impactou na replicação viral (Fig. 11d). Esses resultados sugerem que *Smurf1* modula negativamente a síntese de CXCL1 sem alterar a quantidade de partículas virais durante a infecção por MHV-3, destacando sua participação restrita a aspectos específicos na regulação da resposta imune.

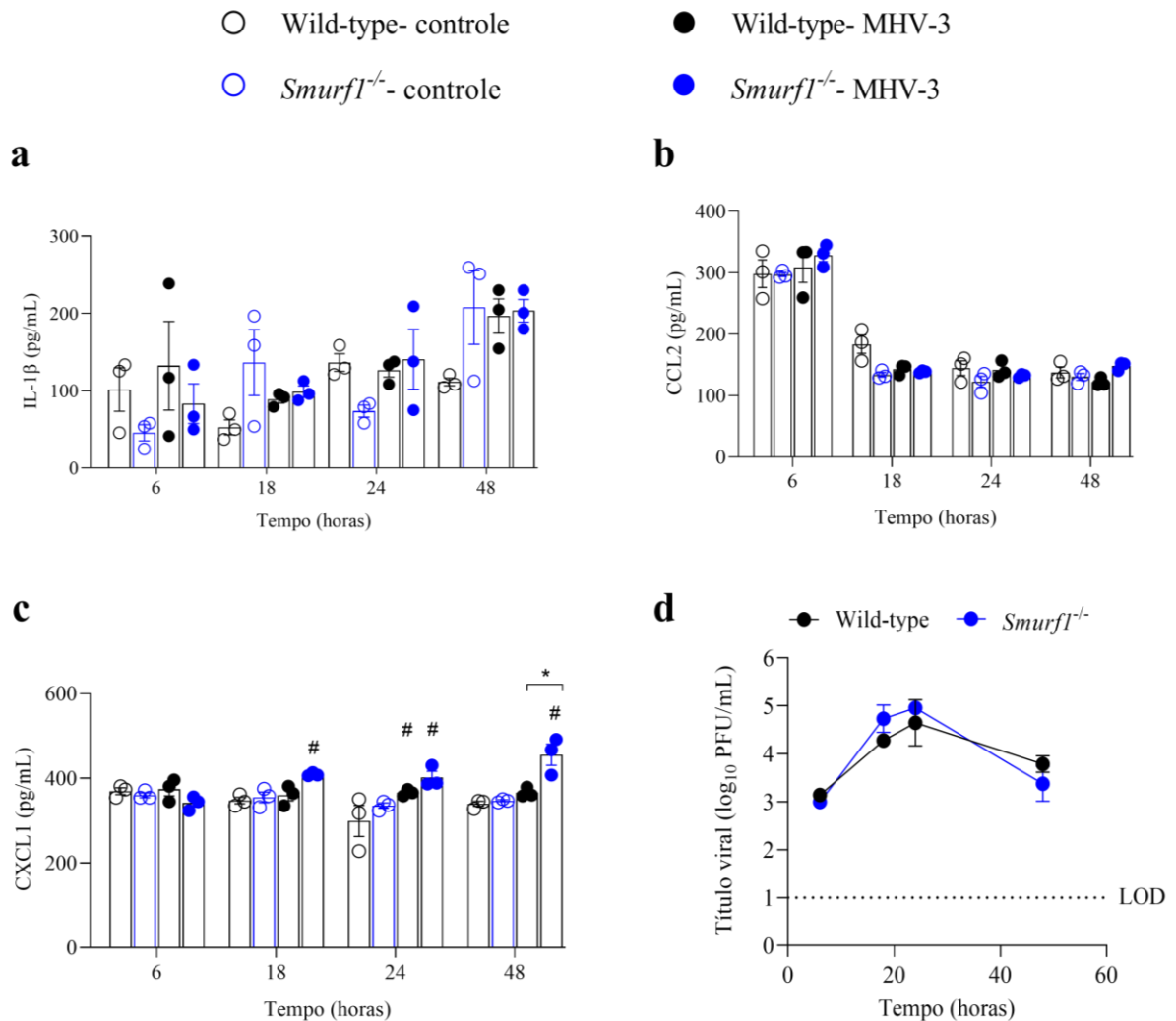


Figura 11. Smurf1 regula a síntese de CXCL1 sem afetar a liberação de vírus em macrófagos infectados por MHV-3. (a – c) BMDMs de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com 0,01 PFU de MHV-3. Níveis de IL-1β (a), CCL2 (b) e CXCL1 (b) foram medidos nos sobrenadantes por ELISA. As barras representam a média ± SEM de amostras em triplicatas. A análise estatística foi realizada usando um teste *two-way* ANOVA. # $p < 0,05$ em comparação com o respectivo grupo controle não infectado; * $p < 0,05$. (d) BMDMs foram infectados conforme indicado acima e o título viral foram medidos nos sobrenadantes. Os dados são mostrados como média ± SEM de amostras triplicadas. A análise estatística foi realizada usando um teste *two-way* ANOVA. LOD: limite de detecção.

4.2. Análise da sobrevida, massa corporal e escore clínico de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-3

A infecção por MHV-3 induz uma resposta inflamatória intensa e desregulada, resultando em desfechos letais em camundongos da linhagem C57BL/6J (ANDRADE et al., 2021). Sabendo disso, buscamos avaliar a importância de Smurf1 em mediar a resistência do hospedeiro contra a infecção por MHV-3 por meio das análises de sobrevida, perda da massa corporal e nos parâmetros clínicos de camundongos infectados com MHV-3.

A princípio, baseado em dados publicados pelo nosso grupo, avaliamos a infecção em diferentes inóculos do MHV-3 (10^3 , 10^2 ou 10^1 PFU), com objetivo de compreender o curso da infecção em camundongo *Smurf1*^{-/-} (ANDRADE et al., 2021). Os dados mostraram que a ausência de Smurf1 não influenciou a sobrevivência dos camundongos infectados, já que não houve diferença significativa entre os grupos Wild-type e *Smurf1*^{-/-}. Ambos os grupos sucumbiram por volta do 6º dia após a infecção (Fig. 12a, b, c). Entretanto, foi observado que os camundongos *Smurf1*^{-/-} infectados com 10^3 PFU, por volta do 4º dia após a infecção, tiveram uma redução da massa corporal (Fig. 12d). Por outro lado, nos inóculos de 10^2 e 10^1 PFU não foi observada nenhuma diferença (Fig. 12e, f). Apesar da redução discreta, a ausência de Smurf1 não alterou os sinais clínicos em nenhum dos inóculos avaliados (Fig 12g, h, i).

Os resultados obtidos sugerem que, embora a deleção de Smurf1 não tenha alterado a sobrevida em camundongos infectados com MHV-3, os camundongos *Smurf1*^{-/-} apresentaram uma perda de massa corporal quando expostos ao inóculo mais elevado (10^3 PFU). No entanto, a ausência de diferenças significativas nos parâmetros clínicos e na progressão da doença entre os grupos reforça a necessidade de investigações adicionais para elucidar os mecanismos específicos pelos quais Smurf1 pode modular a resposta imune e influenciar a gravidade da infecção causada por MHV-3.

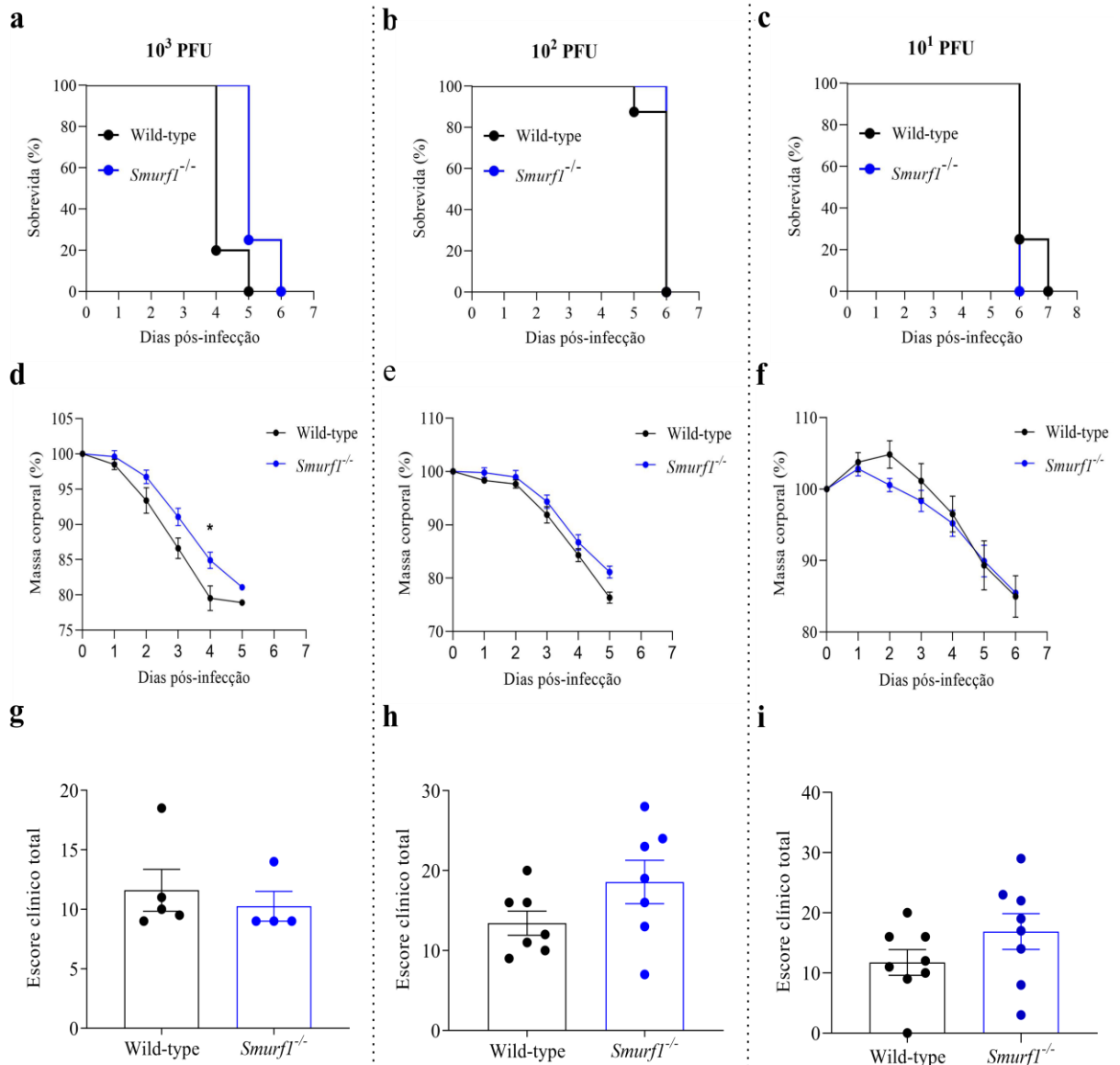


Figura 12. *Smurf1* não influencia na resistência do hospedeiro contra a infecção por MHV-3. **(a - c)** curva de sobrevivência de camundongos Wild-type e *Smurf1*^{-/-} foram infectados com os inóculos de 10^3 **(a)**, 10^2 **(b)** e 10^1 **(c)** PFU do MHV-3. Teste de log-rank; n = 4–8 camundongos/grupo. **(d - f)** Massa corporal dos camundongos infectados com MHV-3. Os dados representam média $\pm$ SEM; n = 4–8 camundongos/grupo. * $p < 0,05$. Teste two-way ANOVA. **(g - i)** Escore clínico dos camundongos infectados com MHV-3. n = 4–8 camundongos/grupo. teste *t Student*.

4.3. Parâmetros hematológicos de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-3

Sabe-se que a infecção por MHV-3 compromete a população de células circulantes que fazem parte do sistema hematopoiético do hospedeiro, acarretando em um quadro de plaquetopenia, trombocitopenia, níveis aumentados de produtos de degradação da fibrina (dímeros D), linfopenia e leucopenia (ANDRADE et al., 2021; TANG et al., 2020; TERPOS et al., 2020). Para investigar se a ausência de *Smurf1* impacta a população de células circulantes no sangue periférico, realizamos experimentos utilizando camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com 10² PFU de MHV-3 e sacrificados por volta do 4º dia pós-infecção.

A princípio, buscamos investigar se a ausência de *Smurf1* impacta no número total de leucócitos circulantes durante a infecção por MHV-3 e observamos que a infecção induziu uma redução de quase 2 vezes no número de leucócitos totais circulantes em ambos os grupos infectados, ocasionando um quadro de leucopenia (Fig. 13a). No entanto, quando avaliamos a quantidade de granulócitos circulantes, camundongos *Smurf1*^{-/-}, mas não camundongos Wild-type, tiveram um aumento significativo quando comparados com os grupos controles (Fig. 13b). Em contraste, a infecção por MHV-3 induziu uma redução na quantidade de linfócitos em ambos os grupos (Fig. 13c), destacando um quadro de linfopenia. Esse desbalanço entre linfócitos e granulócitos na ausência de *Smurf1* resultou em um aumento na razão granulócito por linfócito (G/L) (Fig. 13d), um marcador amplamente utilizado como indicativo de inflamação sistêmica, prognóstico desfavorável em câncer e gravidade em infecções virais, incluindo COVID-19 (FEST et al., 2019; LIU, 2008; SEN et al., 2014; SIMADIBRATA et al., 2021; WULANINGSIH et al., 2016), sugerindo um papel potencial de *Smurf1* na regulação da resposta inflamatória sistêmica durante a infecção por MHV-3.

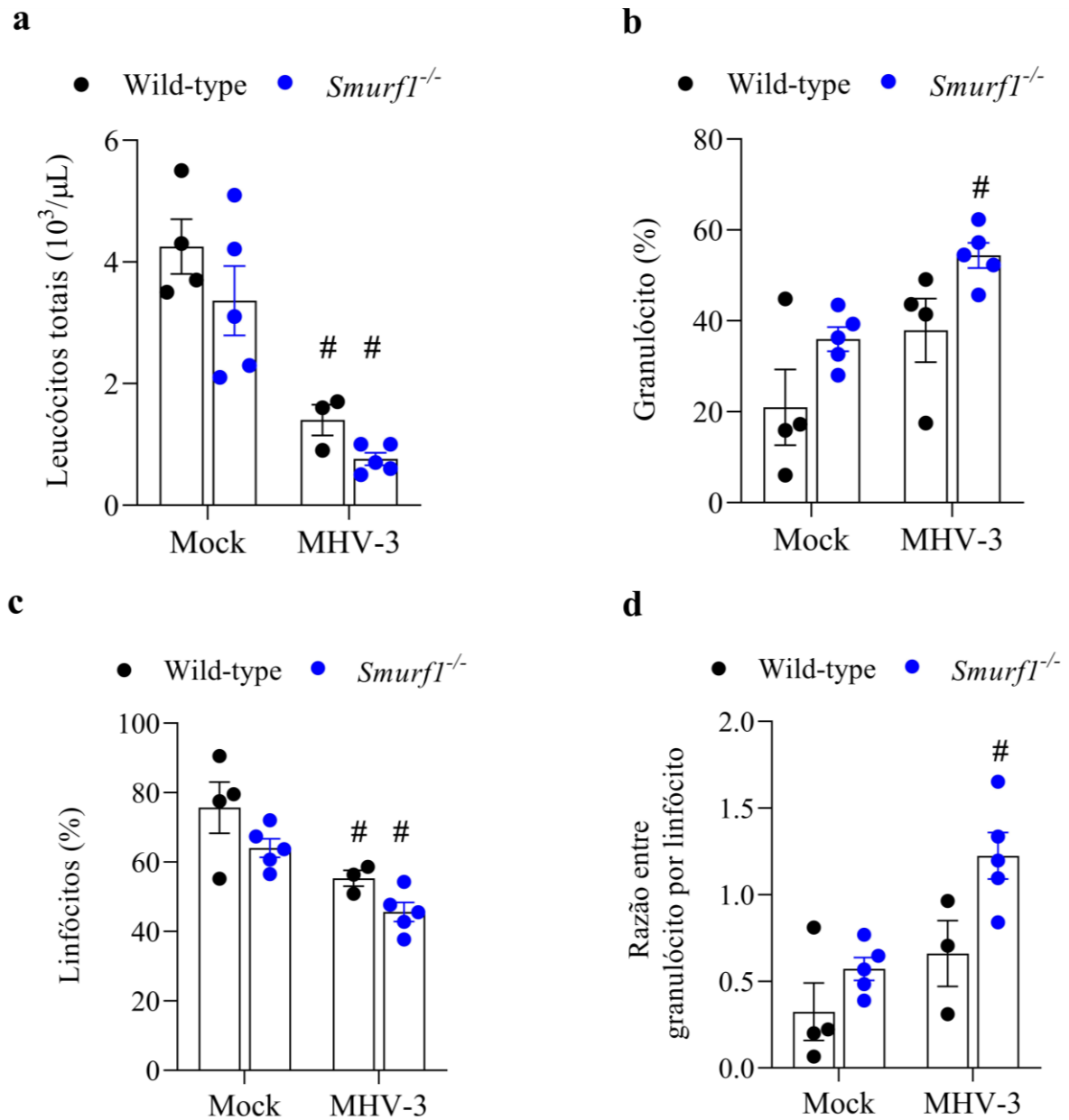


Figura 13. Smurf1 impacta na contagem de células hematológicas em camundongos infectados com MHV-3. **(a – d)** Camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com 10² PFU de MHV-3 e a população de leucócitos totais **(a)**, porcentagem de granulócito **(b)**, linfócito **(c)** e a razão entre granulócito por linfócito **(d)** foram analisadas. Os dados representam média ± SEM; n = 4–5 camundongos/grupo. # *p* < 0,05 quando comparado ao seu respectivo grupo controle (mock). Teste two-way ANOVA.

4.4. Análise dos títulos virais e histopatologia de pulmão e fígado de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-3

Para investigar se a ausência de Smurf1 impacta a liberação das partículas virais infectivas e a patogênese durante infecção por MHV-3, analisamos os títulos virais e o dano histopatológico no tecido pulmonar e hepático de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados. Inicialmente, os resultados indicaram que a ausência de Smurf1 não alterou significativamente na liberação das partículas virais nos pulmões e fígado dos camundongos infectados (Fig. 14a). Embora vírus viável tenha sido detectado nos pulmões, sua presença não influenciou o escore inflamatório pulmonar, demonstrado pela ausência de danos histopatológicos evidentes entre os grupos analisados (Fig. 14b, c).

No entanto, apesar dos títulos virais não alterarem no fígado, ao examinarmos o tecido hepático, foi observado que a infecção por MHV-3 induziu a presença de regiões de necrose tecidual bastante acentuadas, com poucas regiões de infiltrado inflamatório em ambos os grupos infectados (Fig. 14b, linha tracejada). Entretanto, em camundongos *Smurf1*^{-/-} essas regiões de necrose tecidual foram mais evidentes, o que levou a um aumento discreto do escore inflamatório total (Fig. 14b, c). Essa diferença pode estar associada ao tropismo preferencial do MHV-3 pelo fígado, uma vez que sua rápida replicação e propagação através das vias hepáticas podem intensificar os danos nesse órgão. Nossos achados sugerem que Smurf1 pode ter um papel protetor contra a lesão hepática durante a infecção por MHV-3.

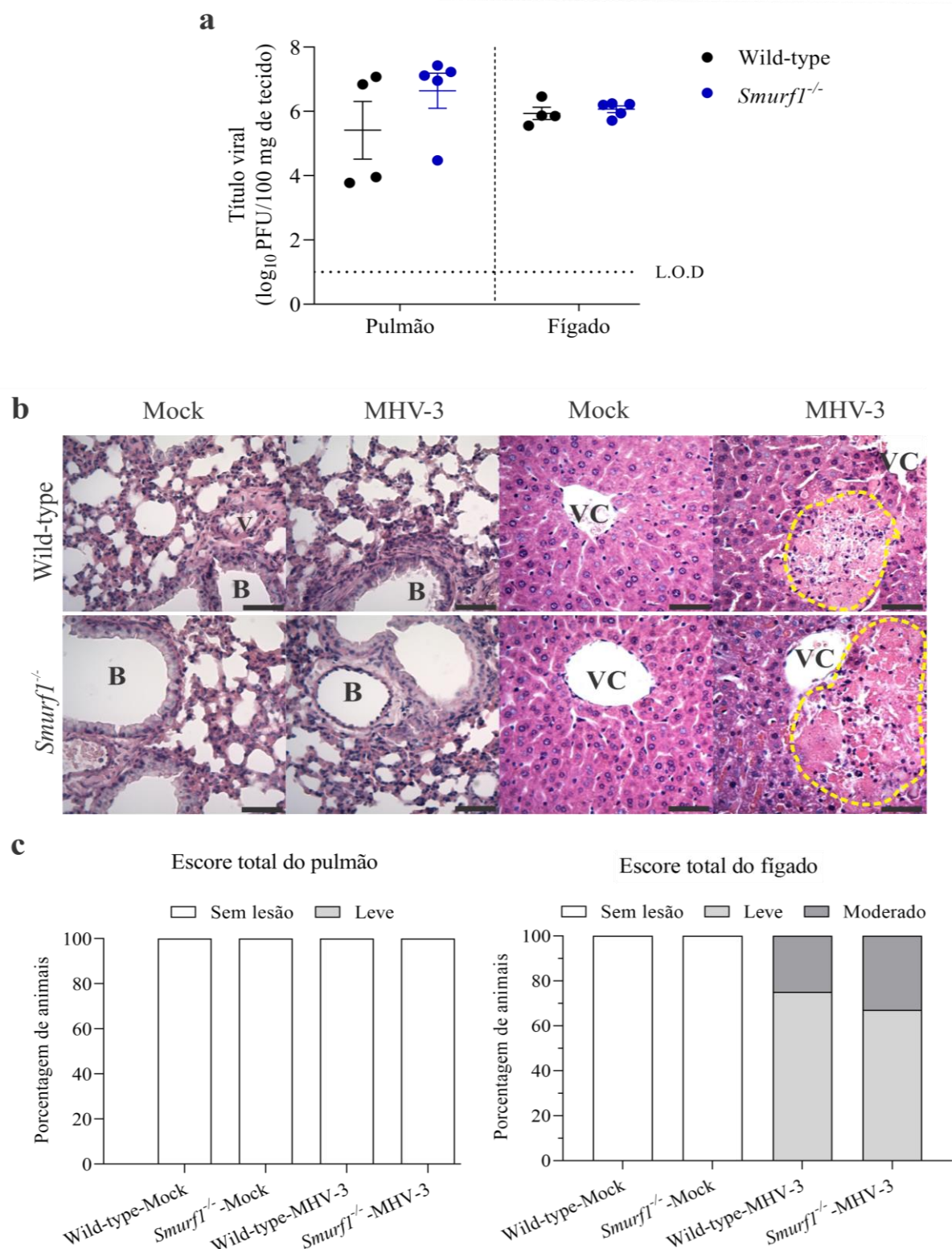


Figura 14. *Smurf1* não influencia os títulos virais nem as alterações histopatológicas no pulmão e fígado de camundongos infectados com MHV-3. **(a)** Camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com 10² PFU do MHV-3 e os títulos virais do pulmão e fígado foram quantificados. Os dados representam média ± SEM; n = 4–5 camundongos/grupo. Dados submetidos ao teste *t* Student. LOD: limite de detecção. **(b)** Histopatologia do pulmão e fígado de camundongos infectados. **(c)** Escore inflamatório total do pulmão e fígados de camundongos infectados. B – bronquíolo, VC – veia central, área pontilhada – região de necrose, barra de escala: 100 µm, coloração: hematoxilina e eosina (H&E).

4.5. Produção de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-3

A infecção por MHV-3 induz a produção exacerbada de mediadores pró-inflamatórios no pulmão, que leva ao dano tecidual mais severo. Baseado nisso, buscamos avaliar a produção de algumas citocinas e quimiocinas no pulmão dos camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-3. Para isso, utilizamos o método de ELISA para quantificamos a produção de mediadores pró-inflamatórios importantes na infecção, como TNF, IL-6 e CCL2. Os dados indicaram que a infecção por MHV-3 não induziu o aumento da produção TNF, IL-6 e CCL2, mesmo na ausência de Smurf1 (Fig. 15a, b). Em contrapartida, os níveis basais de CCL2 em camundongos *Smurf1*^{-/-} apresentaram uma produção mais elevada, sugerindo um papel potencial de Smurf1 na regulação constitutiva dessa quimiocina (Fig. 15c). No geral, Smurf1 não participa da produção dos mediadores pró-inflamatórios durante a infecção por MHV-3.

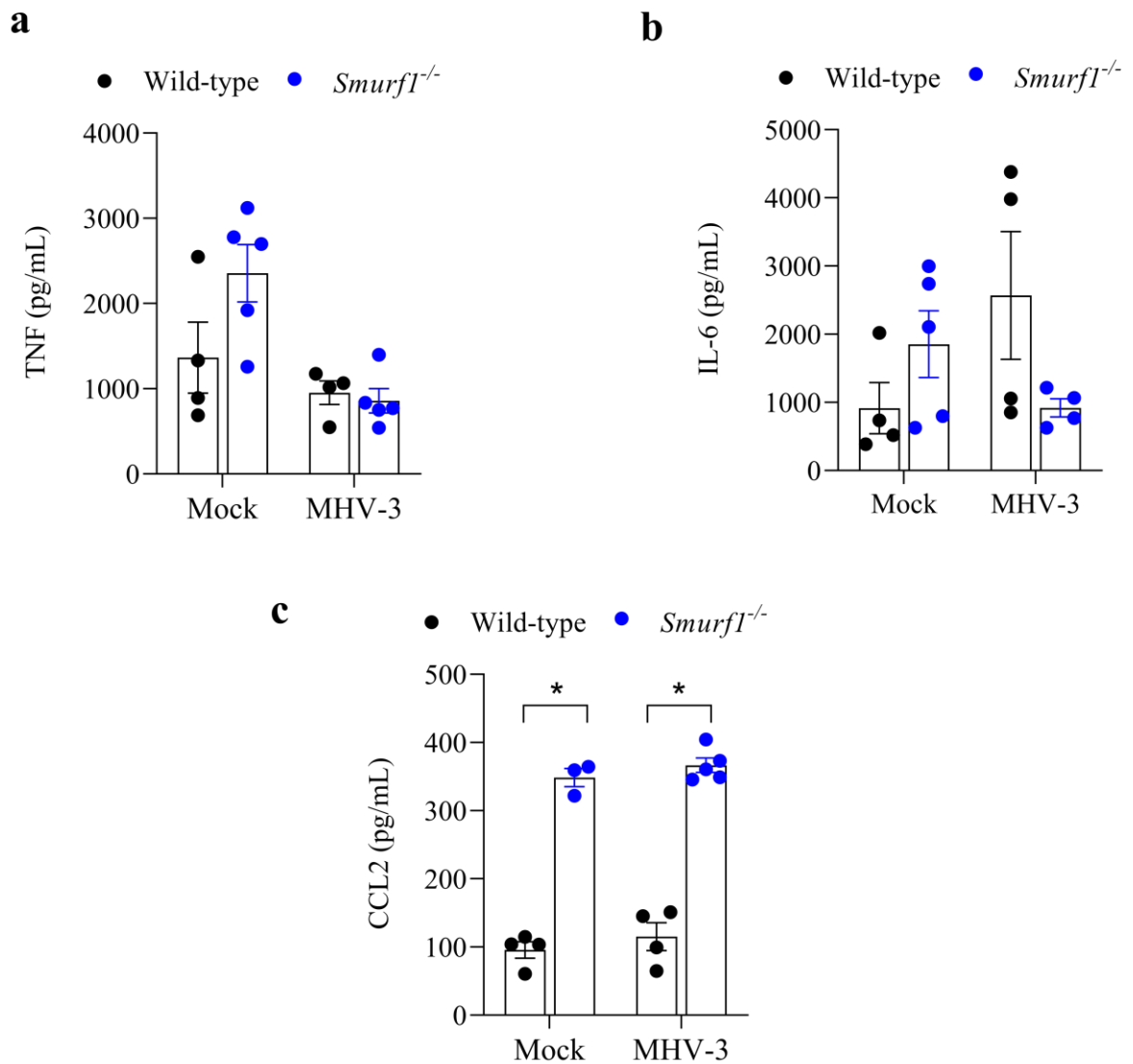


Figura 15. A infecção por MHV-3 não altera a produção dos mediadores inflamatórios intrapulmonar de camundongos infectados com MHV-3. **(a-c)** Camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com 10² PFU do MHV-3 e o ensaio de ELISA foi realizado a partir do homogenato do pulmão para determinar as concentrações de TNF **(a)**, IL-6 **(b)** e CCL2 **(c)** no pulmão camundongos infectados. Os dados representam média ± SEM; n = 4–5 camundongos/grupo. * $p < 0,05$. Teste two-way ANOVA.

4.6. Avaliação de mediadores inflamatórios, título viral e viabilidade celular em BMDMs Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59

Após caracterizar a infecção pelo MHV-3, investigamos o papel de Smurf1 durante a infecção por outro vírus da hepatite murina, o MHV-A59. Ao contrário da infecção por MHV-3, que induz uma inflamação mais grave (ANDRADE et al., 2021), o MHV-A59 mimetiza um modelo de infecção mais branda, podendo induzir sequelas semelhantes às observadas na COVID-19 longa (PIMENTA et al., 2024). Para avaliar a função de Smurf1 na regulação das respostas imunes em macrófagos durante a infecção por MHV-A59, seguindo o mesmo protocolo realizado para a infecção por MHV-3. As BMDMs obtidos de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com MHV-A59 e os sobrenadantes foram coletados nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas para a dosagem de mediadores pró-inflamatórios, títulos virais e viabilidade celular por lactato desidrogenase (LDH) presentes nos sobrenadantes das culturas.

Os dados mostraram que a infecção por MHV-A59 induziu a produção de TNF em BMDMs *Smurf1*^{-/-}, mas não em BMDMs Wild-type, a partir de 12 horas pós-infecção (Fig. 16a). Notavelmente, em 18 horas, a produção de TNF foi detectada em ambos os grupos (Fig. 16a), evidenciando uma resposta antecipada em macrófagos na ausência de Smurf1. Além disso, os níveis de TNF secretados por BMDMs *Smurf1*^{-/-} em 48 e 72 horas após a infecção foram aproximadamente cinco vezes superiores aos observados nos BMDMs Wild-type infectados pelo mesmo vírus (Fig. 16a).

Em relação à produção de IL-6, o MHV-A59 estimulou a secreção dessa citocina em BMDMs Wild-type a partir de 48 horas após a infecção, quando os níveis foram significativamente mais elevados do que os detectados nos controles não infectados (Fig. 16b). Por outro lado, os BMDMs *Smurf1*^{-/-} apresentaram perfis de secreção de IL-6 semelhantes aos dos BMDMs Wild-type na maioria dos tempos avaliados, exceto em 48 horas pós-infecção, momento em que os níveis de IL-6 nos BMDMs *Smurf1*^{-/-} foram menores em comparação com os BMDMs Wild-type infectados (Fig. 16b).

Quanto à produção de CXCL1, o MHV-A59 não induziu sua síntese em BMDMs Wild-type. No entanto, nos BMDMs *Smurf1*^{-/-}, foi observada a secreção de CXCL1 já em 12 horas após a infecção, com níveis superiores em comparação aos grupos controles (Fig. 16c).

Para investigar o papel de Smurf1 na dinâmica da liberação viral em macrófagos infectados, quantificamos os títulos virais presentes nos sobrenadantes de culturas de BMDMs infectados com MHV-A59. Os resultados obtidos revelaram que a ausência de Smurf1 não afetou a fixação e a entrada do vírus nas células, uma vez que os títulos virais foram

equivalentes entre BMDMs Wild-type e *Smurf1*^{-/-} no tempo zero da infecção. Entretanto, a partir de 18 horas pós-infecção, os sobrenadantes de BMDMs *Smurf1*^{-/-} apresentaram uma redução significativa no número de partículas virais infectivas em comparação aos BMDMs Wild-type (Fig. 16d).

Além disso, investigamos a viabilidade celular como um marcador da citotoxicidade induzida pela infecção viral, avaliando a liberação de lactato desidrogenase (LDH) nos sobrenadantes das culturas. Os dados mostraram que a infecção por MHV-A59 induziu níveis elevados de morte celular em BMDMs Wild-type, quando comparados a células não infectadas. No entanto, os BMDMs *Smurf1*^{-/-} apresentaram uma menor liberação de LDH, sugerindo uma menor suscetibilidade à morte celular induzida pela infecção (Fig. 16e). Esse resultado observado em BMDMs *Smurf1*^{-/-} foi dependente da infecção por MHV-A59, uma vez que as células não infectadas, tanto do tipo selvagem quanto *Smurf1*^{-/-}, exibiram níveis comparáveis de LDH. Quando comparadas diretamente, as culturas de BMDMs *Smurf1*^{-/-} infectados apresentaram níveis significativamente mais baixos de liberação de LDH do que os BMDMs do tipo selvagem infectados pelo mesmo vírus (Fig. 16e), destacando uma maior viabilidade celular associada à ausência de Smurf1.

Esses achados apontam que Smurf1 desempenha um papel relevante na modulação da resposta inflamatória, promovendo uma resposta imune mais tardia e facilita a liberação de partículas virais infectivas, ao mesmo tempo em que contribui para a regulação da viabilidade celular em macrófagos durante a infecção por MHV-A59.

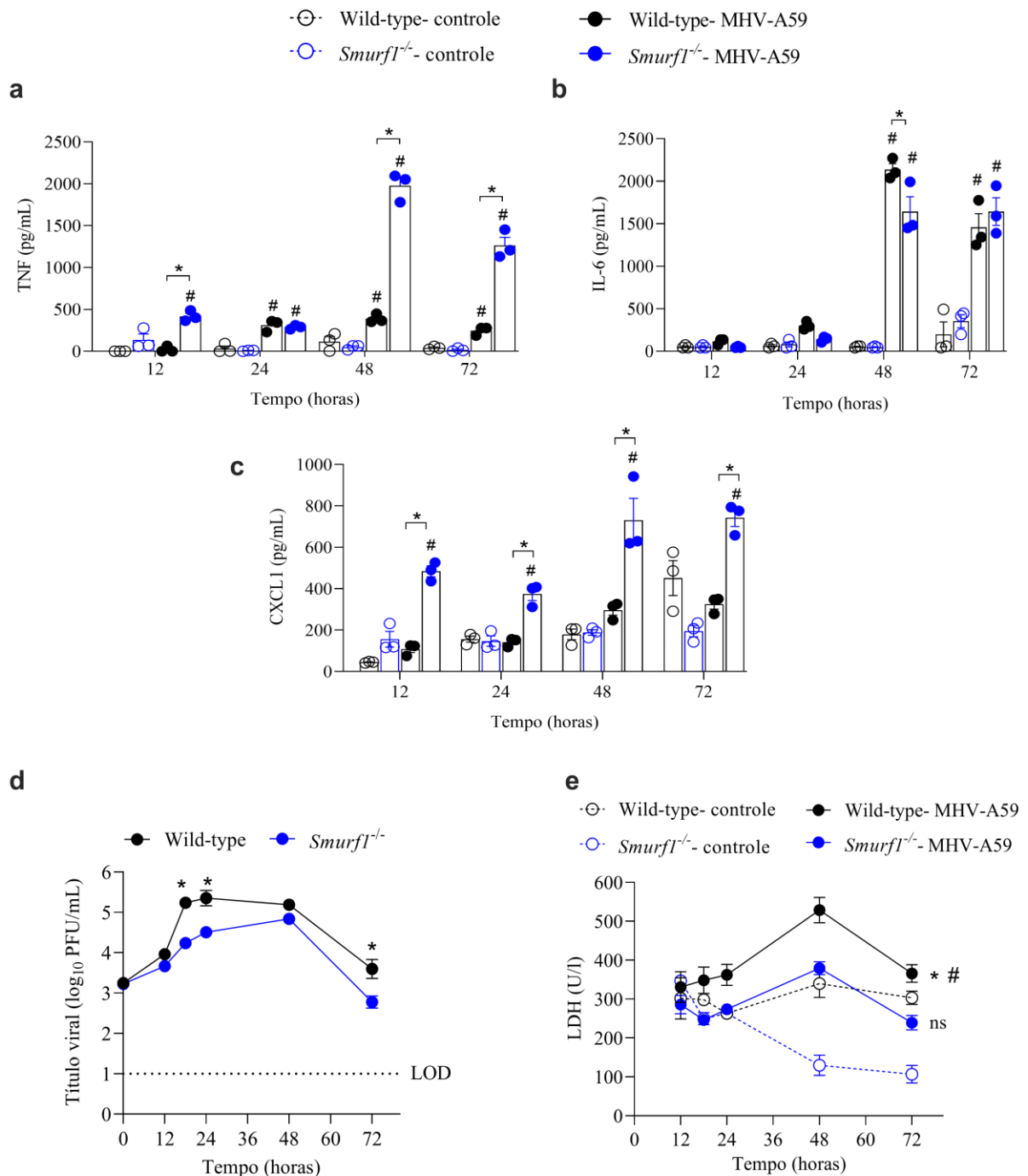


Figura 16. Smurf1 modula a síntese de mediadores pró-inflamatórios, liberação de vírus e viabilidade celular em macrófagos infectados por MHV-A59. **(a – c)** BMDMs de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com 0,01 PFU de MHV-A59 e os níveis de TNF **(a)**, IL-6 **(b)** e CXCL1 **(c)** foram medidos nos sobrenadantes por ELISA. As barras representam a média $\pm$ SEM de amostras triplicadas. A análise estatística foi realizada usando o teste *two-way* ANOVA. # $p < 0,05$ em comparação com o respectivo grupo controle não infectado; * $p < 0,05$. **(d, e)** BMDMs foram infectados conforme indicado acima e o título viral **(d)** e a liberação de LDH **(e)** foram medidos nos sobrenadantes. Os dados são mostrados como média $\pm$ SEM de amostras triplicadas. A análise estatística foi realizada usando um teste *two-way* ANOVA. * $p < 0,05$ ao comparar dados de grupos Wild-type infectados e *Smurf1*^{-/-}; # $p < 0,05$ em comparação com o respectivo grupo controle não infectado; LOD: limite de detecção; ns: não significativo.

4.7. Análise da sobrevida, massa corporal e títulos virais de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59

Nos estudos conduzidos pelo nosso grupo, foi demonstrado que a administração intranasal de um inóculo de alta dose (3×10^5 PFU) do MHV-A59 em camundongos resultou em uma infecção letal, enquanto um inóculo de baixa dose (3×10^4 PFU) induziu uma doença leve e autolimitada (PIMENTA et al., 2024). Com o objetivo de investigar o papel do *Smurf1* na resistência do hospedeiro e na formação e liberação das partículas virais infectivas frente à infecção por MHV-A59, camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-}, foram infectados com inóculos de doses alta (3×10^5 PFU) e baixa (3×10^4 PFU) de MHV-A59. A progressão clínica foi monitorada por meio da avaliação da sobrevida e da perda de massa corporal.

Observou-se que 45% dos camundongos do tipo Wild-type infectados com a dose alta sucumbiram entre o 6º e o 7º dia pós-infecção. Em contraste, todos os camundongos *Smurf1*^{-/-} sucumbiram precocemente, entre o 2º e 6º dias pós-infecção (Fig. 17a). Além disso, embora ambos os grupos tenham apresentado perda de peso significativa em relação aos controles não infectados (mocks), os camundongos *Smurf1*^{-/-} exibiram uma perda de massa corporal mais acentuada em comparação com os camundongos Wild-type infectados (Fig. 17b). Por outro lado, quando infectados com o inóculo de baixa dose, nenhum dos grupos experimentais tiveram perdas (Fig. 17a). No entanto, ambos os grupos apresentaram um atraso no ganho de massa corporal em relação aos controles não infectados (Fig. 17b).

Para verificar se o inóculo de baixa dose resultou em disseminação viral sistêmica e infecção de órgãos-alvo, analisamos os títulos virais nos pulmões e no fígado nos dias 2, 5 e 11 pós-infecção. No 2º dia, os títulos virais nos pulmões foram semelhantes entre os camundongos Wild-type e *Smurf1*^{-/-} (Fig. 17c). Entretanto, no 5º dia, as partículas virais foram eliminadas nos camundongos Wild-type, enquanto os camundongos *Smurf1*^{-/-} ainda apresentaram vírus detectáveis, sugerindo uma depuração viral retardada nesses camundongos (Fig. 17c). No fígado, os títulos virais foram semelhantes nos dois grupos no 5º dia pós-infecção, mas não foram detectadas nos dias 2º e 11º dia pós-infecção (Fig. 17d).

Esses resultados indicam que a infecção intranasal com uma dose baixa de MHV-A59 induz uma doença leve, caracterizada pela instalação inicial da infecção nos pulmões, seguida de disseminação viral sistêmica e posterior envolvimento do fígado. Além disso, os dados sugerem que *Smurf1* contribui para a eliminação viral e na proteção do hospedeiro contra formas graves da infecção por MHV-A59.

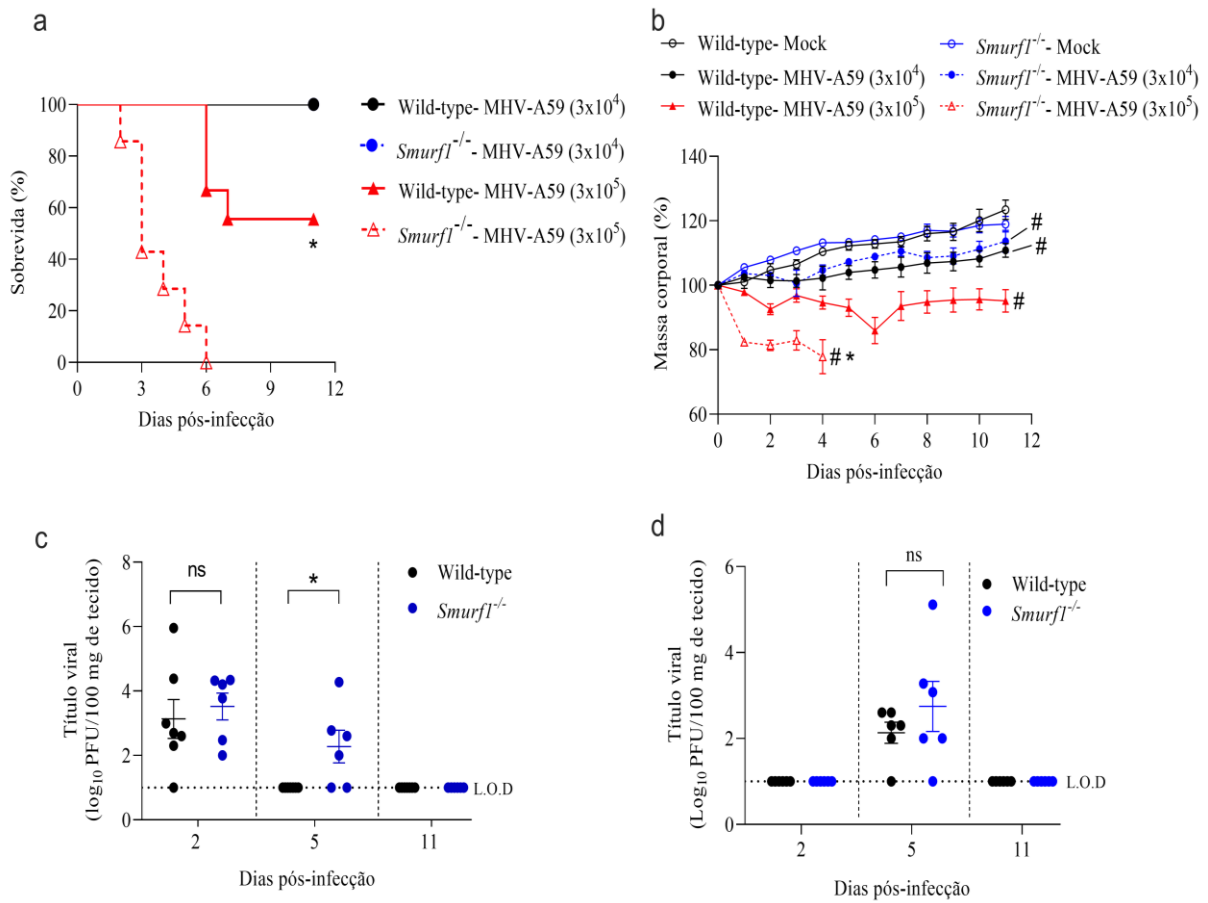


Figura 17. Smurf1 contribui para a resistência do hospedeiro e para depuração viral durante a infecção por MHV-A59. **(a)** Curva de sobrevivência de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com 3×10^4 (inóculo de baixa dose) ou 3×10^5 (inóculo de alta dose) PFU de MHV-A59. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo *Smurf1*^{-/-} infectado com 3×10^5 PFU de MHV-A59. Teste de log-rank; $n = 7-9$ camundongos/grupo. **(b)** Perda de massa corporal em camundongos infectados com MHV-A59. Os dados representam média $\pm$ SEM; $n = 5-9$ camundongos/grupo. # $p < 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo controle (mock); * $p < 0,05$ quando comparado a camundongos Wild-type infectados com 3×10^5 PFU de MHV-A59. Teste two-way ANOVA. **(c , d)** Títulos virais nos pulmões **(c)** e fígado **(d)** de camundongos infectados com 3×10^4 PFU de MHV-A59. Os dados representam média $\pm$ SEM; $n = 6-7$ camundongos/grupo. ns: não significativo. * $p < 0,05$; teste *t* Student. LOD: limite de detecção.

4.8. Parâmetros hematológicos de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59

Considerando que o inóculo de 3×10^4 (baixa dose) de MHV-A59 desencadeia infecção sistêmica, perda de peso e prolonga a sobrevivência tanto em camundongos Wild-type quanto em *Smurf1*^{-/-}, decidimos realizar as análises subsequentes utilizando esse inóculo. A princípio, realizamos análises hematológicas nos dias 2, 5 e 11 após a infecção para investigar possíveis alterações nos perfis de linfócitos e granulócitos no sangue periférico, associadas à infecção sistêmica por MHV-A59.

No segundo dia após a infecção, foi observada leucopenia somente em camundongos *Smurf1*^{-/-} em comparação com seus controles não infectados (Fig. 18a). Em contraste, camundongos Wild-type não apresentaram mudanças significativas no número leucócitos totais durante nenhum dos períodos avaliados (Fig. 18a). Ambos os grupos infectados exibiram aumento significativo na contagem de granulócitos circulantes (Fig. 18b) e redução na contagem de linfócitos (Figura 18c) no 2º dia pós-infecção em comparação com seus respectivos grupos controle. No entanto, enquanto o número de granulócitos e linfócitos nos camundongos do tipo Wild-type retornaram aos valores basais 5º e 11º dias pós-infecção, os camundongos *Smurf1*^{-/-} continuaram apresentando valores anormais até o quinto dia, com recuperação apenas no 11º dia pós-infecção.

Adicionalmente, avaliamos a razão G/L e os resultados mostraram um aumento significativo na razão G/L em ambos os grupos infectados no 2º dia pós-infecção, em comparação com os respectivos controles (Fig. 18d). Contudo, semelhante às análises hematológicas anteriores, a razão G/L nos camundongos Wild-type retornou aos níveis basais nos dias 5 e 11 após a infecção. Por outro lado, os camundongos *Smurf1*^{-/-} continuaram apresentando valores elevados no 5º dia pós-infecção, refletindo um atraso na recuperação do perfil hematológico.

Esses achados indicam que a infecção com MHV-A59 induz alterações hematológicas compatíveis com inflamação sistêmica, similar aos achados encontrados na infecção por MHV-3. Coletivamente, esses dados apontam para um papel de *Smurf1* na resistência do hospedeiro contra a infecção por MHV-A59, modulando a resposta inflamatória e promovendo a restauração do perfil hematológico após a infecção.

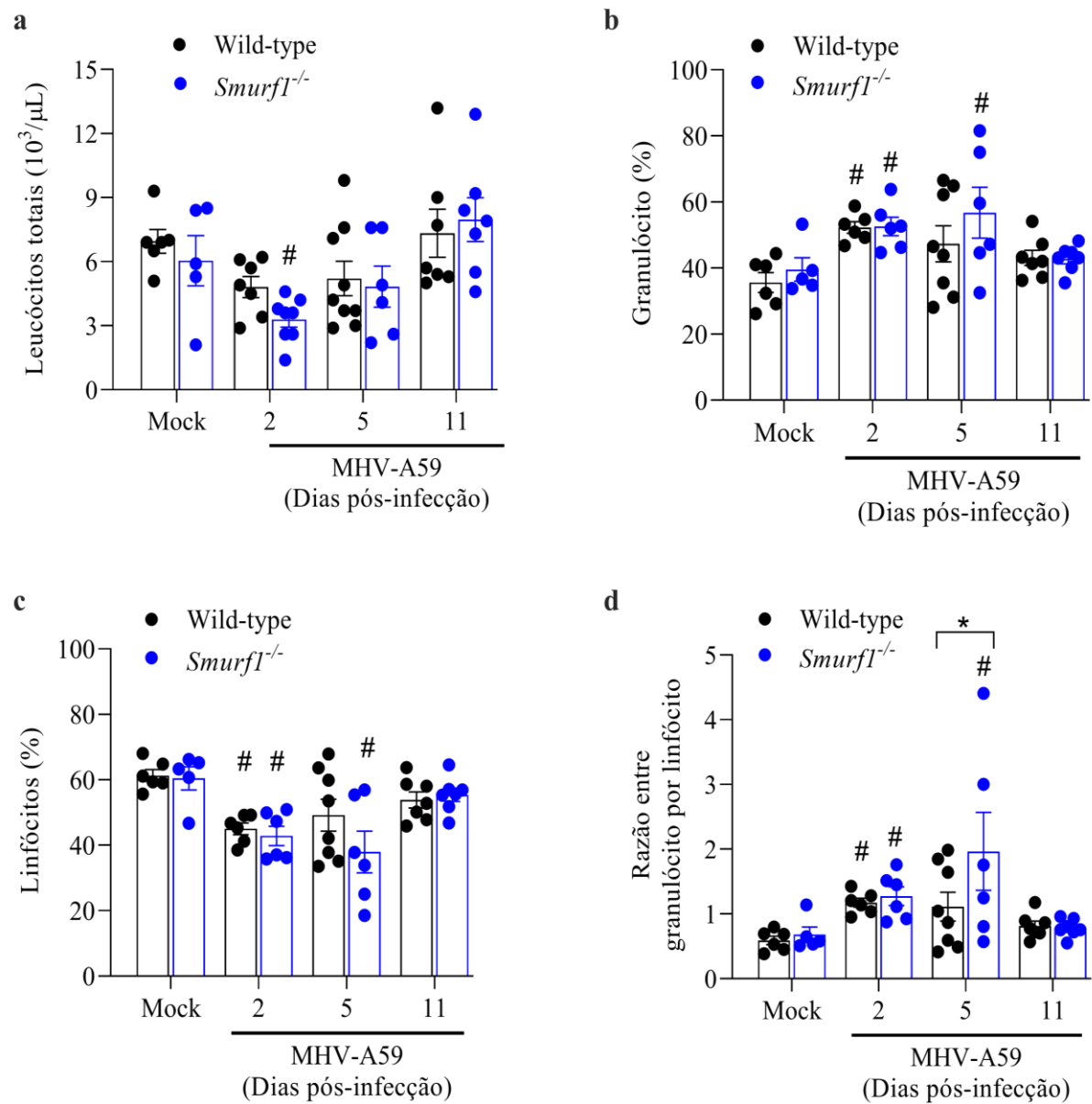


Figura 18. *Smurf1* regula a inflamação sistêmica em camundongos infectados com MHV-A59. **(a – d)** Camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com 3x10⁴ PFU de MHV-A59 e o sangue periférico coletado foi submetido a contagem de leucócitos totais **(a)**, porcentagem de granulócitos **(b)**, linfócito **(c)** e razão entre granulócito por linfócito **(d)** no sangue periférico de camundongos infectados com MHV-A59. Os dados representam média ± SEM; n = 5–9 camundongos/grupo. * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo controle (mock). Teste *One-way* ANOVA.

4.9. Avaliação da expressão de marcadores inflamatórios e dano histopatológico no pulmão de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59

Diante dos dados acima apresentados, e considerando que os camundongos *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59 em inóculo de baixa dose apresentaram parâmetros hematológicos anormais, especialmente no 5º dia pós-infecção, sugerindo um potencial desbalanço inflamatório, conduzimos análises adicionais em amostras de pulmão coletadas nesse mesmo período. Inicialmente, avaliamos se a infecção por MHV-A59 induz o aumento da expressão de Smurf1 nos pulmões de camundongos infectados. Os resultados mostraram uma regulação positiva na expressão do mRNA de Smurf1 nos pulmões de camundongos do tipo selvagem após a infecção com MHV-A59 (Fig. 19a), sugerindo um possível envolvimento de Smurf1 na modulação da resposta imune e no controle da inflamação local.

Em seguida, investigamos a expressão do mRNA de IFN- β , um marcador central da resposta inflamatória antiviral, nos pulmões de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-}. Os dados revelaram que os camundongos *Smurf1*^{-/-} exibiram uma expressão significativamente maior de IFN- β em comparação com os camundongos Wild-type (Fig. 19b), sugerindo para um possível desequilíbrio da resposta inflamatória na ausência de Smurf1.

Apesar das alterações moleculares observadas, a análise histopatológica pulmonar revelou que ambos os grupos, Wild-type e *Smurf1*^{-/-}, apresentaram alterações semelhantes após a infecção por MHV-A59 (Fig. 19c, d). Isso sugere que, embora a ausência de Smurf1 esteja associada a um aumento na resposta inflamatória inicial, essa diferença não se traduz em alterações histopatológicas significativas no tecido pulmonar no período analisado.

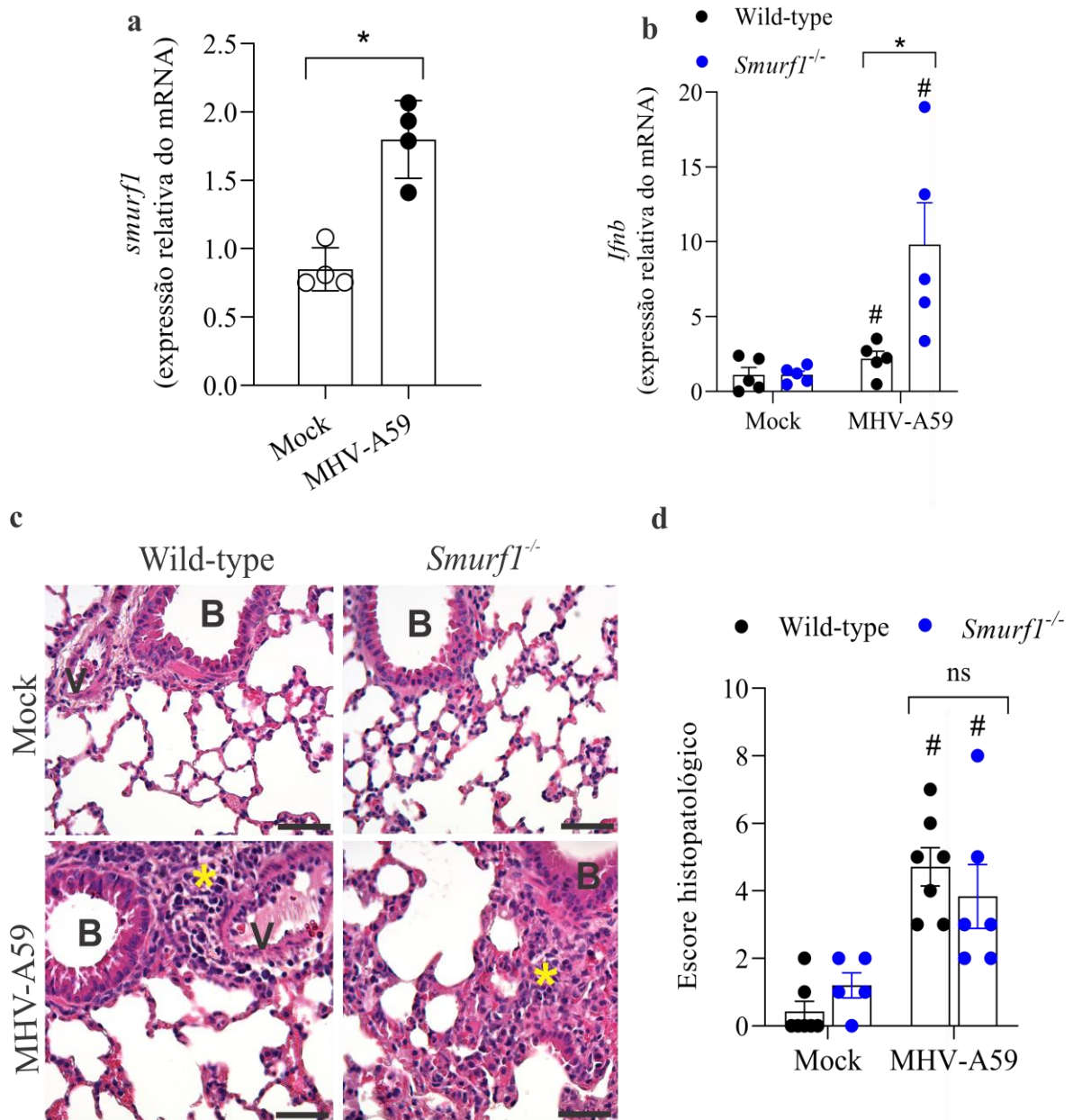


Figura 19. Smurf1 regula a resposta antiviral sem alterar o dano histopatológico pulmonar em camundongos infectados com MHV-A59. **(a, b)** Camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com 3×10^4 PFU de MHV-A59 e avaliados quanto a expressão do mRNA de Smurf1 **(a)** e a expressão do mRNA de IFN- β **(b)**. Os dados representam média $\pm$ SEM; $n = 4-5$ camundongos/grupo. * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo controle (mock). teste *t* Student. teste two-way ANOVA. **(c, d)** Histopatologia do tecido pulmonar. Asterisco: células mononucleares/polimorfonucleares. B: bronquíolo; V: vênulas; Barras, 100 μ m. Hematoxilina e Eosina (H&E). Os dados representam média $\pm$ SEM; $n = 5-7$ camundongos/grupo. # $p < 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo controle (mock); ns: não significativo; teste two-way ANOVA.

4.10. Produção de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59

Para compreender melhor o impacto da ausência de Smurf1 na modulação da resposta inflamatória pulmonar durante a infecção por MHV-A59, realizamos uma análise detalhada da produção de citocinas e quimiocinas nesse modelo. Para isso, o homogenato do pulmão dos camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59 foram submetidos ao ensaio de ELISA e os níveis de mediadores inflamatórios TNF, IL-6, CCL2, CXCL1 e CCL5 foram quantificados.

Os resultados obtidos revelaram que a infecção por MHV-A59 não induziu o aumento da produção de TNF e IL-6, mesmo na ausência de Smurf1 (Fig. 20a, b). Do mesmo modo, a infecção não alterou o perfil das quimiocinas CXCL1, CCL2 e CCL5, em ambos os grupos experimentais, independentemente da presença ou ausência de infecção (Fig. 20c-e). Esses resultados indicam que Smurf1 não participa da regulação desses mediadores inflamatórios nos pulmões durante a resposta imune induzida pelo MHV-A59. Em síntese, nossos achados sugerem que a infecção por MHV-A59 induz uma resposta inflamatória relativamente branda, sem diferenças significativas na produção de mediadores inflamatórios analisados entre camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-}.

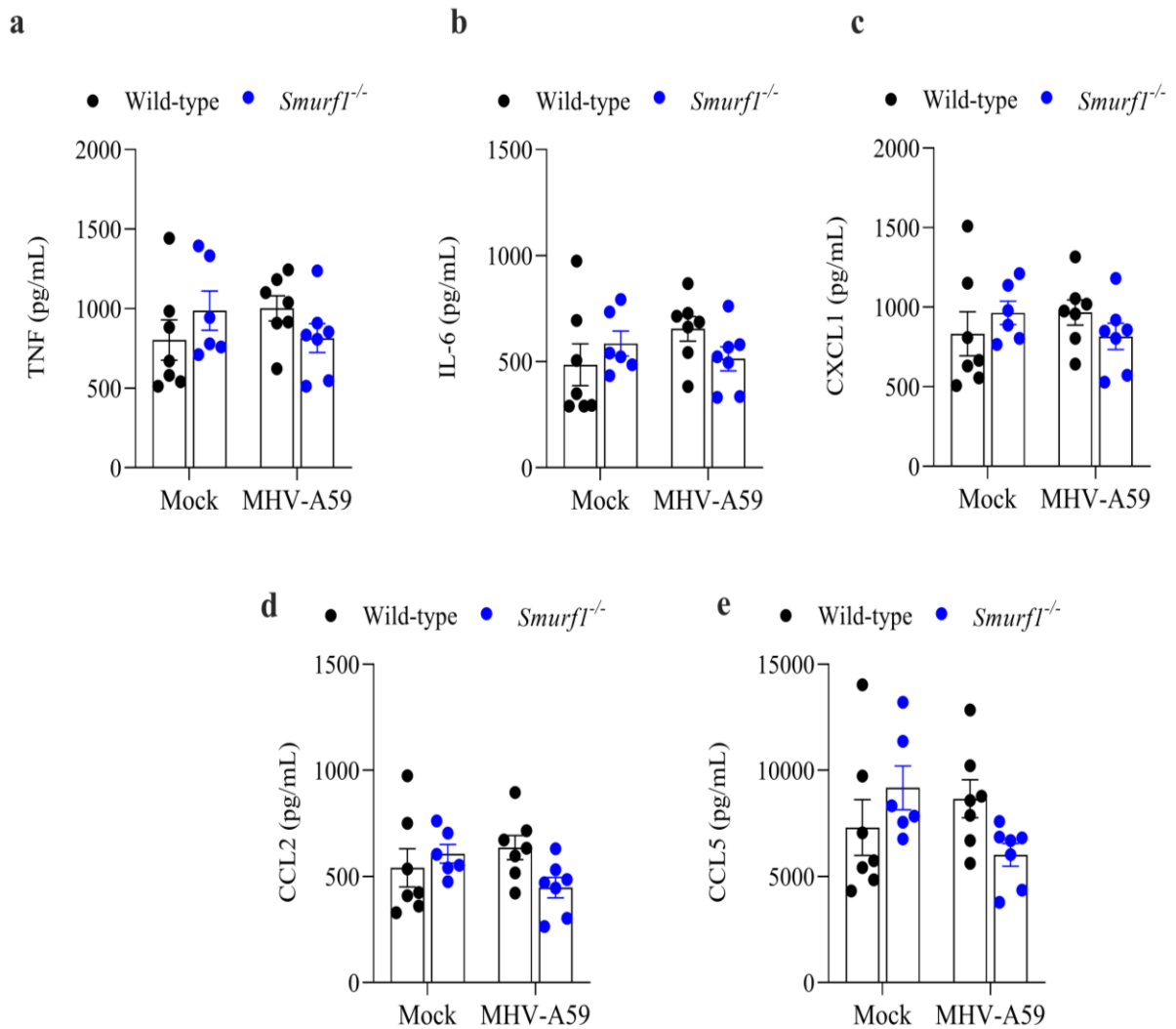


Figura 20. A infecção por MHV-A59 não altera a produção dos mediadores inflamatórios intrapulmonar de camundongos infectados com MHV-A59. **(a-c)** Camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com 3×10^4 PFU do MHV-A59 e o ensaio de ELISA foi realizado a partir do homogenato do pulmão para determinar as concentrações de TNF **(a)**, IL-6 **(b)**, CXCL1 **(c)**, CCL2 **(d)** e CCL5 **(e)**. Os dados representam média $\pm$ SEM; n = 7–8 camundongos/grupo. Teste two-way ANOVA.

4.11. Avaliação do perfil celular e inflamatório de macrófagos e neutrófilos pulmonares em camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59

Sabendo que as células da imunidade inata, como macrófagos e neutrófilos, desempenham um papel central na alta mortalidade de pacientes graves com COVID-19, buscamos caracterizar detalhadamente o perfil dessas populações celulares durante a infecção por MHV-A59. Para isso, realizamos análises por citometria de fluxo a fim de avaliar a ativação e o perfil inflamatório dessas células nos pulmões de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-}.

Inicialmente, investigamos a ativação de macrófagos e neutrófilos, utilizando a expressão de MHC de classe II como marcador fenotípico. Os resultados revelaram que a porcentagem de macrófagos e neutrófilos MHC-II⁺ foi semelhante entre os grupos infectados, independentemente do genótipo dos camundongos (Fig. 21a, b). Esses achados indicam que a ausência de *Smurf1* não compromete a capacidade basal dessas células de se ativarem em resposta à infecção por MHV-A59.

Para aprofundar a avaliação do perfil inflamatório, analisamos a produção intracelular de TNF, iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e IL-10 como marcadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. A análise revelou que a infecção por MHV-A59 resultou em um aumento significativo na proporção de macrófagos positivos para TNF, iNOS e IL-10 nos pulmões de camundongos *Smurf1*^{-/-} em comparação com os Wild-type (Fig. 21c). Além disso, os neutrófilos dos camundongos *Smurf1*^{-/-} também apresentaram maior proporção de células produtoras de TNF em comparação com os camundongos Wild-type (Fig. 21d). Esses dados sugerem que a ausência de *Smurf1* promove uma resposta inflamatória mais robusta e potencialmente desregulada nos pulmões, caracterizada pelo aumento de mediadores pró-inflamatórios e imunorreguladores.

No geral, os resultados indicam que, embora a ativação fenotípica de macrófagos e neutrófilos (baseada na expressão de MHC-II) não seja afetada pela ausência de *Smurf1*, esses animais exibem um perfil inflamatório exacerbado, evidenciado pelo aumento na expressão de TNF, iNOS e IL-10 em macrófagos, além de TNF em neutrófilos. Esses achados sugerem que *Smurf1* atua como um regulador da resposta inflamatória em macrófagos e neutrófilos pulmonares, modulando a produção de mediadores inflamatórios e contribuindo para a homeostase imunológica durante a infecção viral por MHV-A59.

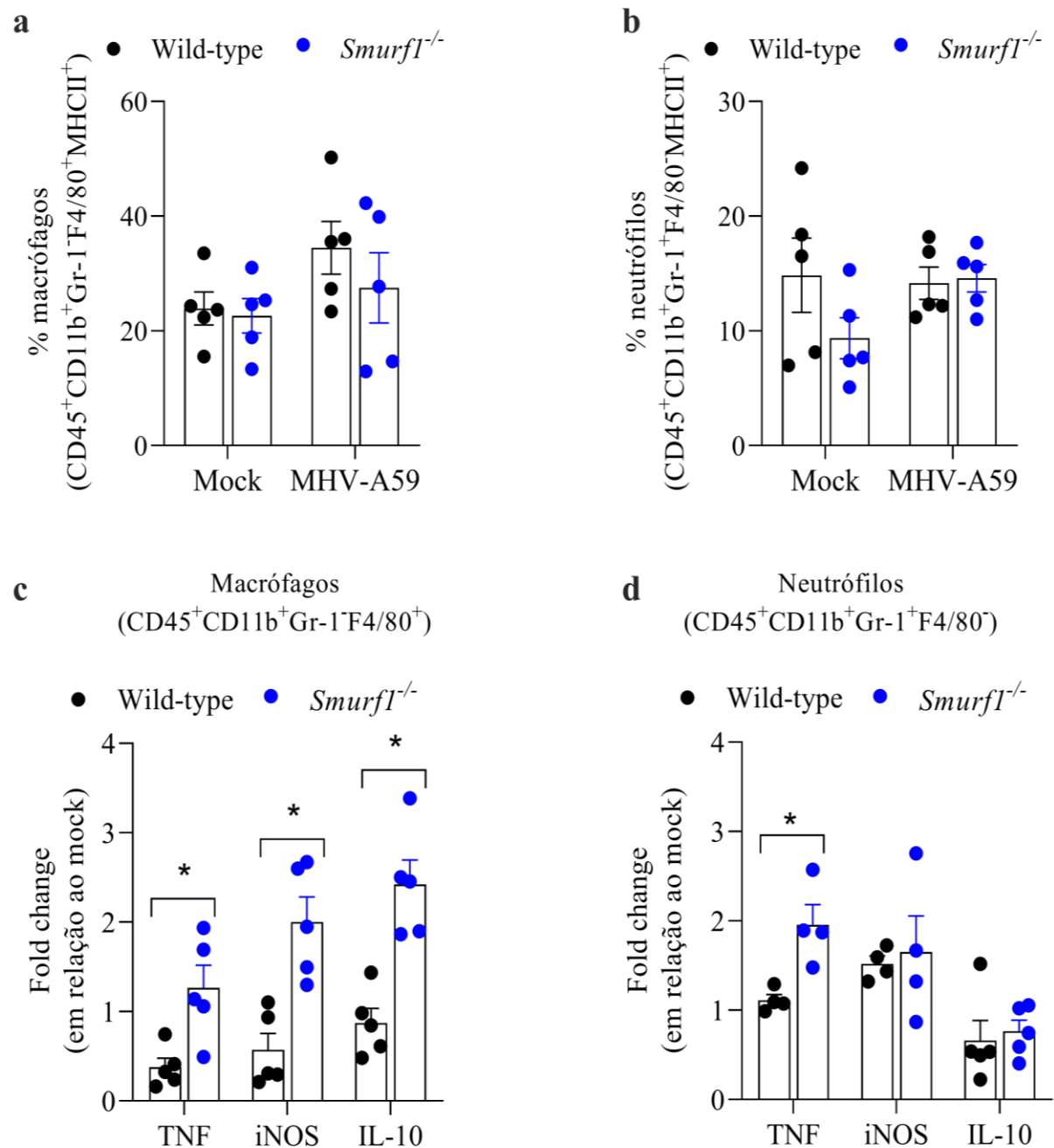


Figura 21. Smurf1 regula o perfil inflamatório em macrófagos e neutrófilos no pulmão de camundongos infectados com MHV-A59. **(a – d)** Camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com 3x10⁴ PFU de MHV-A59 e a análise de citometria de fluxo mostra os macrófagos ativados (CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁻F4/80⁺ MHCII⁺) **(a)** e neutrófilos (CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁻MHCII⁺) **(b)** pulmonares. Os dados representam média ± SEM; n = 4–5 camundongos/grupo; teste two-way ANOVA. Análise de macrófagos e neutrófilos pulmonares positivos para TNF, iNOS ou IL-10 **(c, d)** de camundongos infectados. Os dados representam média ± SEM; n = 4–5 camundongos/grupo. * *p* < 0,05; teste *t Student*.

4.12. Avaliação da expressão de Smurf1, dano histopatológico e marcadores enzimáticos no fígado de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59

Baseados nos dados de MHV-3, avaliamos influência de Smurf1 no fígado dos camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} com MHV-A59. Inicialmente, avaliamos a expressão do mRNA de Smurf1 no fígado dos camundongos infectados. Diferentemente do padrão observado nos pulmões, a infecção por MHV-A59 não induziu um aumento significativo na expressão de Smurf1 no fígado dos camundongos Wild-type no 5º dia pós-infecção (Fig. 22a). Esse achado sugere que a regulação de Smurf1 em resposta à infecção pode ser específica para tecidos, sendo mais proeminente nos pulmões do que no fígado.

Já análise histopatológica revelou que a infecção hepática induziu alterações histopatológicas e inflamatórias distintas em ambos os genótipos. Nos camundongos Wild-type, observamos um aumento do infiltrado inflamatório, vasodilatação leve e acúmulo localizado de leucócitos (Fig. 22b, asteriscos). Por outro lado, os camundongos *Smurf1*^{-/-} exibiram lesões hepáticas mais pronunciadas, caracterizadas por hiper celularidade exacerbada, necrose extensa e maior incidência de morte celular (Fig. 22b, linha tracejada) e isso refletiu em um aumento do escore histopatológico total (Fig. 22c).

A gravidade do dano hepático nos camundongos *Smurf1*^{-/-} corroborada por um escore histopatológico significativamente mais elevado, resultou no aumento dos níveis séricos das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) (Fig. 22d) e aspartato aminotransferase (AST) (Fig. 22e), ambos marcadores bioquímicos de lesão hepática e disfunção celular para prognóstico na COVID-19 (FUKUI et al., 2022; MEDETALIBEYOGLU et al., 2020; WU et al., 2020b). Esses resultados sugerem que a ausência de Smurf1 agrava a inflamação hepática e prejudica a integridade do tecido durante a infecção por MHV-A59.

Em resumo, os dados obtidos indicam que Smurf1 não é induzido no fígado após a infecção por MHV-A59, diferentemente do observado nos pulmões no 5º dia pós-infecção. Entretanto, sua ausência está associada a um fenótipo inflamatório exacerbado e maior dano hepático, evidenciado pelo infiltrado inflamatório, necrose e aumento de enzimas hepáticas. Esses achados reforçam o papel de Smurf1 na regulação da resposta inflamatória e na proteção contra danos teciduais em infecções virais, destacando sua importância para a homeostase imunológica no contexto hepático.

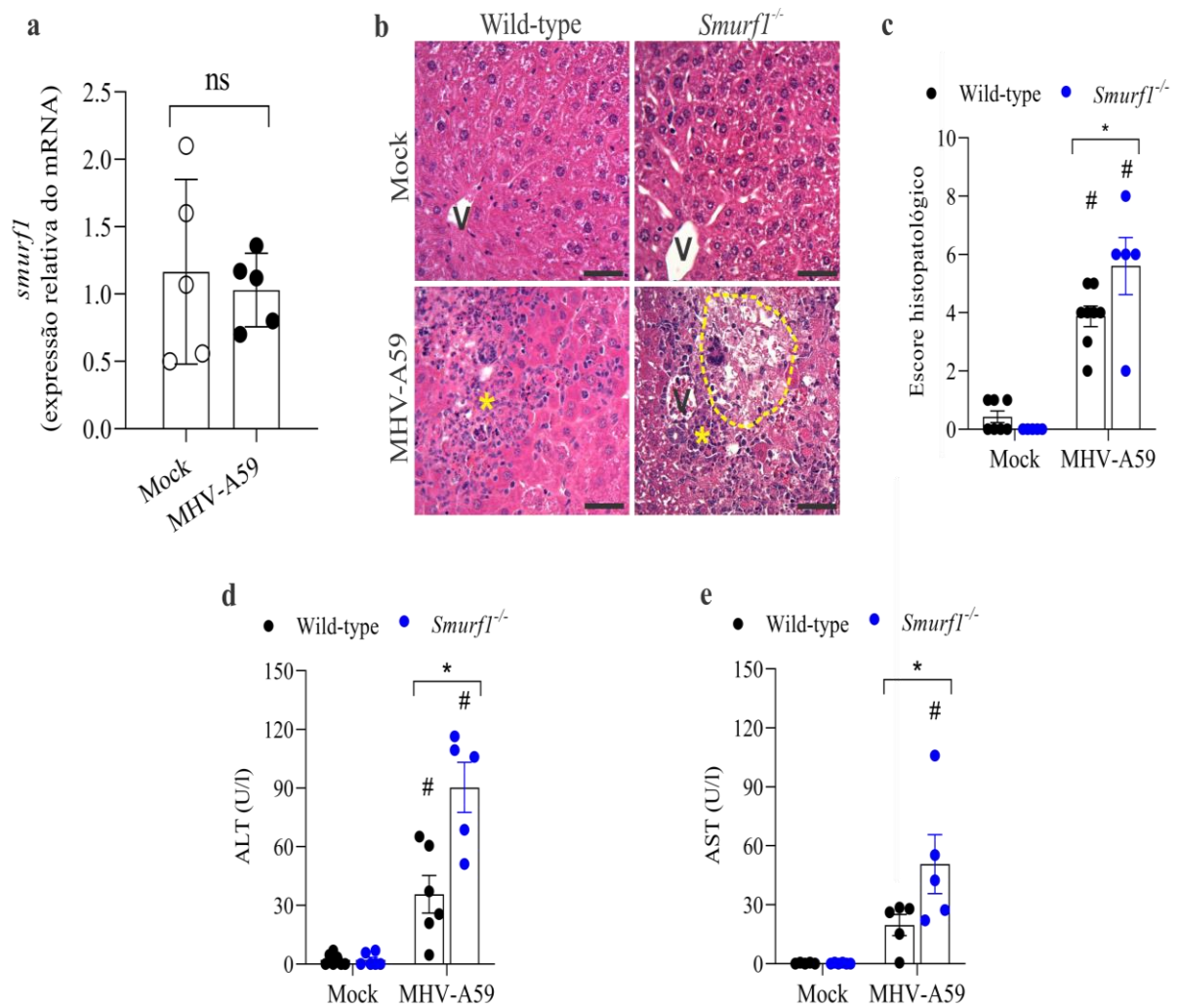


Figura 22. Smurf1 é crucial para integridade do tecido hepático em camundongos infectados com MHV-A59. **(a – e)** Camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com 3x10⁴ PFU de MHV-A59. **(a)** Expressão de mRNA de Smurf1 no fígado de camundongos Wild-type infectados com MHV-A59. Os dados representam média ± SEM; n = 5 camundongos/grupo; teste *t Student*. ns: não significativo. **(b, c)** Histopatologia do fígado de camundongos infectados com MHV-A59. Asterisco: acúmulo de leucócitos; linha tracejada: área de necrose; V: vênulas; Barras, 100 μm. * *p* < 0,05; # *p* < 0,05 quando comparados ao respectivo grupo controles; teste *two-way ANOVA*. **(d, e)** Níveis séricos de alanina aminotransaminase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) de camundongos infectados. Os dados representam média ± SEM; n = 5–7 camundongos/grupo. * *p* < 0,05; # *p* < 0,05 quando comparados ao respectivo grupo controle (mock); teste *two-way ANOVA*.

4.13. Expressão de mediadores inflamatórios no fígado de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59

Diante das alterações histopatológicas e do aumento da severidade do dano hepático observados nos camundongos *Smurf1*^{-/-}, investigamos a expressão de mediadores pró-inflamatórios no tecido hepático desses animais, visando compreender melhor o papel do gene *Smurf1* na regulação da resposta imune local.

Inicialmente, avaliamos a expressão do mRNA de IFN- β , TNF e IL-6, que desempenham papéis centrais na ativação e modulação da resposta inflamatória antiviral. A análise revelou que a infecção por MHV-A59 não induziu a expressão de IFN- β e TNF no fígado de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-}, indicando uma resposta inflamatória menos pronunciada ou retardada nesses mediadores específicos (Fig. 23a, b).

Por outro lado, ambos os grupos de camundongos, Wild-type e *Smurf1*^{-/-}, apresentaram aumento significativo na expressão de IL-6 após a infecção em comparação com os grupos simulados (Fig. 23c). Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas na expressão de IL-6 entre os dois genótipos infectados, sugerindo que a ausência de *Smurf1* não altera diretamente a produção desse mediador pró-inflamatório no fígado. Esses achados reforçam a necessidade de investigar mecanismos adicionais pelos quais *Smurf1* pode modular a resposta inflamatória hepática e contribuir para a proteção tecidual durante a infecção por MHV-A59.

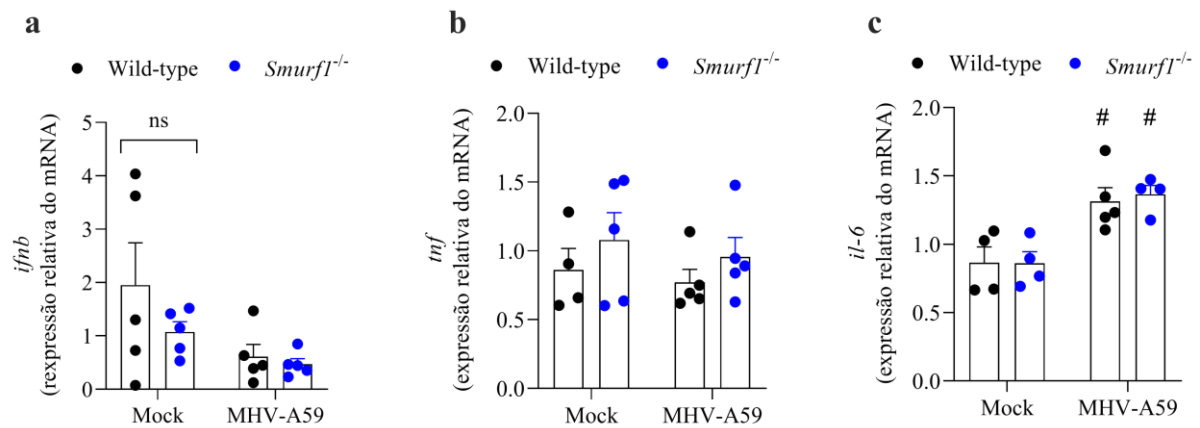


Figura 23. *Smurf1* não altera da expressão dos mediadores pró-inflamatórios hepáticos durante a infecção por MHV-A59. **(a–c)** Camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com 3×10^4 PFU de MHV-A59 e avaliados quanto a expressão do mRNA para IFN- β **(a)**, TNF **(b)** e IL-6 **(c)** no fígado de camundongos infectados com MHV-A59. Os dados representam média $\pm$ SEM; $n = 4$ –5 camundongos/grupo. # $p < 0,05$ quando comparados ao respectivo grupo controle (mock); teste two-way ANOVA.

4.14. Avaliação do perfil celular e inflamatório de macrófagos e neutrófilos hepáticos de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59

Com base na caracterização do perfil celular realizada nos pulmões de camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59, conduzimos uma análise semelhante no fígado desses camundongos, por meio da técnica de citometria de fluxo.

A análise revelou que, no 5º dia pós-infecção, o fígado dos camundongos de ambos os grupos apresentaram porcentagens semelhantes de macrófagos e neutrófilos ativados, evidenciados pela expressão de MHC classe II (Fig. 24 a, b). No entanto, foi observado que o fígado dos camundongos *Smurf1*^{-/-} apresentou uma proporção significativamente maior de macrófagos TNF⁺ quando comparado aos camundongos Wild-type (Fig. 24c). Em contraste, a proporção de neutrófilos positivos para TNF e iNOS foi reduzida no fígado dos camundongos *Smurf1*^{-/-} (Fig. 24c).

Esses achados sugerem que, embora o Smurf1 não tenha um impacto no recrutamento de macrófagos e neutrófilos para os pulmões e fígado durante a infecção por MHV-A59, ele desempenha um papel essencial na regulação do perfil inflamatório dessas células infiltrantes nos órgãos. De maneira geral, essas evidências indicam que o Smurf1 exerce um papel importante no controle das respostas inflamatórias, tanto nos pulmões quanto no fígado, durante a infecção por MHV-A59.

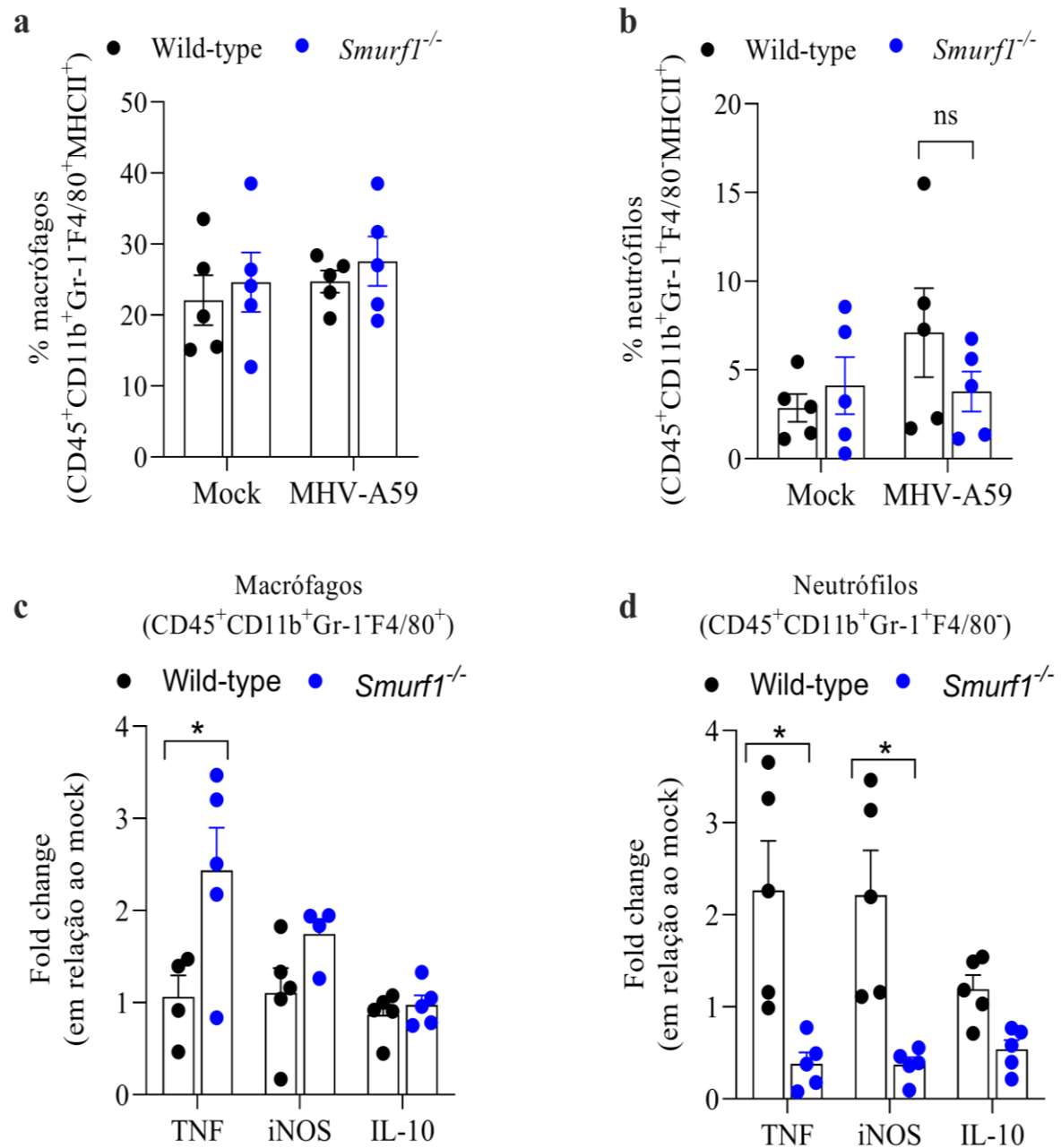


Figura 24. Smurf1 regula o perfil inflamatório em macrófagos e neutrófilos no fígado de camundongos infectados com MHV-A59. **(a – d)** Camundongos Wild-type ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados com 3×10^4 PFU de MHV-A59 e a análise de citometria de fluxo mostra os macrófagos ativados (CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺MHCII⁺) **(a)** e neutrófilos (CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺MHCII⁺) **(b)** hepáticos. Os dados representam média $\pm$ SEM; n = 4–5 camundongos/grupo; teste two-way ANOVA. Análise de macrófagos e neutrófilos hepáticos positivos para TNF, iNOS ou IL-10 **(c, d)** de camundongos infectados. Os dados representam média $\pm$ SEM; n = 4–5 camundongos/grupo. * $p < 0,05$; teste *t* Student.

5. DISCUSSÃO

Os *Betacoronavirus* compreendem um grupo diversificado de patógenos capazes de causar doenças humanas que variam desde infecções leves do trato respiratório superior, como o resfriado comum, até formas graves de pneumonia, como a COVID-19 (KÖRNER et al., 2020; PAROTTO et al., 2023). Diante disso, a compreensão dos mecanismos pelos quais os fatores do hospedeiro regulam as respostas imunes a essas infecções torna-se essencial para o desenvolvimento de vacinas e terapias eficazes. Neste estudo, demonstramos que a E3 ubiquitina-ligase Smurf1 desempenha um papel diferenciado, porém, com algumas semelhanças, durante a infecção por MHV-3 e MHV-A59. Os resultados indicaram que a ausência de Smurf1 não impacta significativamente a sobrevivência, a variação de massa corporal ou o escore clínico geral em camundongos infectados com MHV-3. Em contraste, observou-se que a deficiência de Smurf1 aumentou a suscetibilidade à infecção intranasal por MHV-A59, evidenciando um papel crítico desse regulador na resposta antiviral específica para esse modelo de infecção.

De modo geral, as análises hematológicas realizadas durante as infecções por MHV-3 e MHV-A59 revelaram que o Smurf1 exerce uma função reguladora na modulação da inflamação sistêmica em ambos os contextos virais. Contudo, na infecção por MHV-A59, a ausência de Smurf1 destacou-se devido às alterações hematológicas associadas a processos inflamatórios exacerbados, como o aumento da expressão de mRNA de IFN- β nos pulmões e a elevação dos marcadores inflamatórios, incluindo TNF e iNOS, em macrófagos pulmonares e neutrófilos. Essa resposta inflamatória acentuada foi correlacionada com uma depuração viral tardia nos pulmões, sugerindo que Smurf1 possui um papel imunomodulador relevante na contenção do processo inflamatório pulmonar. Além disso, os camundongos deficientes de Smurf1 apresentaram marcadores bioquímicos de lesão hepática, como elevações nos níveis séricos de ALT e AST, acompanhadas por necrose tecidual e aumento na proporção de macrófagos TNF-positivos no fígado, evidenciando um impacto inflamatório sistêmico mais pronunciado em camundongos *Smurf1*^{-/-}.

A análise da resposta inflamatória em BMDMs infectados com MHV-3 revelou que, de maneira geral, não foram observadas alterações expressivas na produção de mediadores pró-inflamatórios mesmo na ausência de Smurf1. No entanto, um achado relevante foi o aumento significativo na produção de CXCL1 em BMDMs de camundongos *Smurf1*^{-/-}, sugerindo que Smurf1 desempenha um papel modulador na regulação da produção dessa quimiocina

específica, que é conhecida por atuar no recrutamento de neutrófilos para locais de inflamação (ANTONIAK et al., 2021; JOHANSSON; KIRSEBOM, 2021; NAUMENKO et al., 2018).

Já na infecção por MHV-A59, nossos resultados destacaram um papel central de Smurf1 na regulação das respostas inflamatórias e antivirais mediadas por macrófagos. Os BMDMs obtidos de camundongos *Smurf1*^{-/-} apresentaram secreção significativamente aumentada de mediadores pró-inflamatórios não só de CXCL1, como mostrado na infecção por MHV-3, mas também de TNF, quando estimulados *in vitro*. Esses achados sugerem que Smurf1 atua como um modulador crítico na produção dessas moléculas, que estão diretamente envolvidas no recrutamento e ativação de células imunes durante processos inflamatórios agudos.

Curiosamente, também observamos que os BMDMs *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59 exibiram uma capacidade aprimorada de reduzir a liberação da partículas virais infectivas e limitar a morte celular induzida pelo vírus. Esse achado implica que Smurf1 pode estar envolvido não apenas na regulação da inflamação, mas também na montagem e no processamento da partícula viral. Além disso, seu papel na modulação da morte celular sugere um possível mecanismo protetor associados a mecanismos intracelular importante para a sobrevivência da célula, como a morte celular mediada por apoptose (BARBER, 2001; O'BRIEN, 1998; PAUL; MÜNZ, 2016; SIR; JAMES OU, 2010).

Os *Betacoronavirus* seguem um ciclo replicativo intracelular altamente complexo, composto por etapas sucessivas, incluindo adesão e entrada na célula, replicação do genoma viral, montagem de novas partículas virais e, por fim, egressão ou liberação para infectar novas células-alvo (BRACQUEMOND; MURIAUX, 2021). Estudos recentes sugerem que a atividade de ubiquitina-ligase desempenha um papel crucial na regulação dessas fases, especialmente na egressão viral. Por exemplo, no vírus Ebola, a proteína VP40 interage diretamente com o domínio WW da ligase de ubiquitina WWP1 do hospedeiro, facilitando a sua egressão e propagação (HAN et al., 2017). Nossos achados *in vitro* reforçam essa hipótese ao demonstrarem uma redução significativa nos títulos virais nos sobrenadantes de BMDMs de camundongos *Smurf1*^{-/-} infectados com MHV-A59. Esse resultado sugere que Smurf1, por meio dos domínios WW (CAO; ZHANG, 2013), pode estar envolvido na promoção da egressão viral, possivelmente interagindo com proteínas virais do MHV-A59 ainda não identificadas. Uma especulação fundamentada é que essa interação ocorra por meio dos domínios WW de Smurf1, de forma semelhante à interação recentemente demonstrada entre Smurf1 e a proteína spike do SARS-CoV-2 (NOVELLI et al., 2021), facilitando, assim, a liberação eficiente do vírus das células infectadas.

Estudos anteriores realizados por nosso grupo mostraram que a infecção por MHV-3 induz inflamação sistêmica generalizada, caracterizada por trombocitopenia acentuada, linfopenia e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF (ANDRADE et al., 2021; PEREIRA et al., 2023). Esse perfil inflamatório reflete, em certa medida, características clínicas observadas em casos graves e moderados de COVID-19. Os resultados obtidos neste estudo também reforçam as observações anteriores, especialmente no modelo de infecção por MHV-3. No entanto, o papel específico de Smurf1 nesse contexto foi menos evidente, possivelmente devido à rápida progressão da doença e ao caráter altamente letal da infecção.

No modelo utilizado para estudar o papel de Smurf1 na modulação da resposta inflamatória durante a infecção por MHV-3, não foi possível avaliar sua influência específica na resposta inflamatória nos pulmões. A ausência de lesões pulmonares pode ser explicada pela dinâmica rápida do MHV-3 no trato respiratório, resultando em uma possível perda do pico de infecção pulmonar durante o processo experimental. Esse padrão reforça a ideia de que o vírus rapidamente atinge outros órgãos-alvo, dificultando a detecção precisa do impacto de Smurf1 nos estágios iniciais da infecção pulmonar. Diferente dos achados no pulmão, no fígado a ausência de Smurf1 teve um impacto discreto, mas significativo, com a presença de áreas de necrose tecidual mais acentuadas. Esse padrão reforça a ideia de que o MHV-3 rapidamente atinge outros órgãos-alvo, como o fígado, dificultando a detecção precisa do impacto de Smurf1 nos estágios iniciais da infecção. Apesar dessas limitações, é relevante ressaltar que a ausência de Smurf1 foi associada a um agravamento na linfopenia e ao aumento na razão granulócito/linfócito, na qual é considerada um marcador de prognóstico em pacientes com COVID-19 (FEST et al., 2019; LIU, 2008; SEN et al., 2014; SIMADIBRATA et al., 2021; WULANINGSIH et al., 2016).

Esses achados sugerem que, embora Smurf1 possa desempenhar um papel imunomodulador na inflamação sistêmica, observada nas análises hematológicas, sua contribuição na infecção por MHV-3 pode ser mascarada pela gravidade progressiva e rápida da doença, exigindo abordagens experimentais alternativas para melhor compreensão do seu envolvimento nesse modelo específico.

Por outro lado, os resultados deste estudo destacam o papel de Smurf1 como um regulador da resposta inflamatória sistêmica, durante a infecção por MHV-A59, particularmente na inflamação mediada por macrófagos e neutrófilos. Evidências clínicas e experimentais já demonstraram que inflamações descontroladas, desencadeadas por essas células imunes, estão diretamente associadas à gravidade da COVID-19, levando a danos

teciduais extensivos e falência de múltiplos órgãos (PAROTTO et al., 2023). Da mesma forma, modelos experimentais de infecção por *Betacoronavirus* murino revelam que a imunopatologia pulmonar e hepática está correlacionada com infiltração excessiva de células inflamatórias e secreção elevada de mediadores pró-inflamatórios, como TNF e iNOS, além de morte celular e necrose tecidual (ANDRADE et al., 2021; PEREIRA et al., 2023; PIMENTA et al., 2024).

Nos pulmões de camundongos *Smurf1*^{-/-}, observamos um aumento expressivo na proporção de macrófagos e neutrófilos positivos para TNF e iNOS após a infecção por MHV-A59. Essa observação reforça a hipótese de que a ausência de Smurf1 induz a uma resposta inflamatória exacerbada, caracterizada por ativação descontrolada de células imunes inatas e produção elevada de mediadores inflamatórios. Esse perfil inflamatório hiperativo pode estar associado a um atraso na depuração viral e a um aumento nos danos teciduais pulmonares, potencialmente exacerbando a gravidade da infecção.

No fígado, os efeitos da ausência de Smurf1 foram ainda mais pronunciados. Observamos um aumento significativo na proporção de macrófagos produtores de TNF, acompanhado por elevações nos níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST, marcadores bioquímicos classicamente associados a lesão hepatocelular e disfunção hepática (FUKUI et al., 2022; MEDETALIBEYOGLU et al., 2020; WU et al., 2020b). Esse quadro inflamatório desregulado indica que Smurf1 pode exercer um papel essencial na contenção da resposta inflamatória hepática, prevenindo o desenvolvimento de lesões teciduais extensas e necrose associadas à infecção viral sistêmica.

Com base nesses achados, levantamos a hipótese de que Smurf1 regula negativamente a resposta inflamatória de macrófagos ao atuar em vias de sinalização intracelular associadas à ubiquitinação e degradação proteica. Estudos prévios já demonstraram que Smurf1 interage diretamente com moléculas-chave na resposta antiviral inata, como MAVS, STAT1, TRAF3, TRAF6, e USP25, todas envolvidas na regulação de cascatas inflamatórias e na resposta imune mediada por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (LI et al., 2022; QIAN et al., 2018; WANG; TONG; YE, 2012; YUAN et al., 2012b; ZHANG et al., 2018). Na ausência de Smurf1, a degradação desregulada desses substratos poderia levar à ativação exacerbada de vias inflamatórias, resultando no aumento da produção de fatores pró-inflamatórios e em alterações histopatológicas nos pulmões e no fígado. Essa hipótese é sustentada pelo aumento observado na expressão de IFN- β nos pulmões de camundongos *Smurf1*^{-/-}, sugerindo amplificação da sinalização antiviral em resposta à infecção viral.

Apesar da resposta inflamatória exacerbada detectada nos pulmões e fígados de camundongos *Smurf1*^{-/-}, danos histopatológicos significativos foram identificados

predominantemente no fígado. Essa discrepância pode ser explicada por dois fatores principais: I) características intrínsecas do vírus e II) funções específicas de Smurf1 na fisiologia hepática. Primeiramente, como o MHV-A59 replica-se inicialmente no trato respiratório, mas dissemina-se sistemicamente e é predominantemente depurado no fígado, sua presença nos pulmões é transitória (KÖRNER et al., 2020). Esse padrão de replicação pode limitar a gravidade dos danos pulmonares em camundongos *Smurf1*^{-/-}, ao mesmo tempo em que contribui para lesões hepáticas mais prolongadas e severas devido à persistência viral e inflamação sustentada nesse órgão. Em segundo lugar, Smurf1 pode exercer funções intrínsecas na homeostase hepática, incluindo regulação de processos como apoptose, metabolismo celular e controle de vias inflamatórias específicas. A ausência de Smurf1 pode, portanto, predispor os camundongos *Smurf1*^{-/-} a danos hepáticos mais intensos durante a infecção viral, exacerbando a inflamação sistêmica e comprometendo a função hepática. Além disso, os dados hematológicos, incluindo aumento na leucopenia e na razão granulócitos/linfócitos, refletem características inflamatórias sistêmicas semelhantes às observadas em casos graves de COVID-19, reforçando a relevância translacional desses achados (ANDRADE et al., 2021; PAROTTO et al., 2023; PIMENTA et al., 2024).

Embora nenhum dano histopatológico significativo tenha sido detectado nos pulmões após infecções com inóculo de dose baixa, sugerimos que a maior mortalidade observada em camundongos *Smurf1*^{-/-} expostos ao inóculo de alta dose pode ser atribuída à soma de inflamação pulmonar exacerbada e danos hepáticos graves, ambos mediados por macrófagos e neutrófilos hiperativados. Nossos achados ressaltam que Smurf1 atua como um regulador essencial da resposta inflamatória durante a infecção por Betacoronavírus, modulando a ativação de macrófagos e neutrófilos e controlando a produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF, iNOS e IFN- β . Em sua ausência, observou-se uma desregulação inflamatória significativa, resultando em lesões hepáticas severas e inflamação pulmonar exacerbada, o que comprometeu a recuperação dos camundongos infectados. Esses resultados sugerem que Smurf1 desempenha papel protetor ao prevenir respostas inflamatórias descontroladas e danos teciduais, especialmente em órgãos como o fígado.

Além de atuar como mediador na egressão viral, as ubiquitina-ligases também desempenham funções críticas em mecanismos autônomos celulares relacionados à degradação de proteínas virais e à eliminação do vírus. Por exemplo, foi relatado que a ubiquitina ligase RNF5 tem como alvo a proteína E do envelope do SARS-CoV-2 para degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma, o que reduz a replicação viral (LI et al., 2023). Da mesma forma, estudos prévios indicaram que Smurf1 participa ativamente da virofagia, um processo

especializado de autofagia direcionado à degradação de componentes virais intracelulares, ao interagir com cápsídeos do vírus Sindbis e do herpes simplex em fibroblastos e células HeLa (CHOI; BOWMAN; JUNG, 2018; ORVEDAHL et al., 2011).

Nossos dados *in vivo* fornecem evidências adicionais para a hipótese que Smurf1 é importante para eliminação do MHV-A59, uma vez que no 5º dia pós-infecção, o vírus permaneceu detectável apenas nos pulmões dos camundongos *Smurf1*^{-/-}, enquanto que em camundongos Wild-type já não era mais possível identificá-lo. Esse achado sugere que o Smurf1 pode estar envolvido em mecanismos intracelulares específicos que contribuem para a eliminação precoce do vírus nos camundongos selvagens, provavelmente por meio da virofagia ou de outros processos degradativos mediados por vias associadas ao sistema ubiquitina-proteassoma.

Os resultados obtidos neste estudo destacam Smurf1 como um regulador multifuncional essencial durante a infecção por MHV-A59, exercendo papéis críticos na promoção da egressão viral e na eliminação intracelular de partículas virais. Essa dupla função contribui significativamente para a resolução eficiente da infecção e limita a disseminação sistêmica do vírus, prevenindo complicações associadas à persistência viral. No contexto de infecções por betacoronavírus, caracterizadas por respostas inflamatórias desreguladas e replicação viral prolongada, a capacidade de Smurf1 de modular esses processos torna-se particularmente relevante. Esse papel regulador sugere que Smurf1 pode ser explorado como um alvo terapêutico promissor para o desenvolvimento de estratégias antivirais que atenuem a hiperinflamação e os danos teciduais associados a infecções graves, como a COVID-19.

6. CONCLUSÃO

Este estudo revelou que a ubiquitina-ligase Smurf1 regula a inflamação em infecções por *Betacoronavirus*, desempenhando funções semelhantes em alguns aspectos nos modelos murinos de MHV-3 e MHV-A59. Embora sua ausência não tenha afetado significativamente a progressão da infecção por MHV-3, mostrou-se crucial para conter a resposta inflamatória exacerbada e a maior suscetibilidade ao MHV-A59. Smurf1 modula mediadores pró-inflamatórios, como TNF, iNOS e CXCL1. Sua função é essencial para equilibrar a ativação inflamatória induzida pelo vírus, prevenindo danos teciduais. Assim, Smurf1 se destaca como um regulador da imunidade inata e um potencial alvo terapêutico para infecções virais e controle da inflamação.

7. REFERÊNCIAS

- AKUTSU, M.; DIKIC, I.; BREMM, A. Ubiquitin chain diversity at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 5, p. 875–880, 2016.
- ANDRADE, A. C. DOS S. P. et al. A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus-Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations. **Journal of Virology**, v. 95, n. 22, 27 out. 2021.
- ANTONIAK, S. et al. PAR1 regulation of CXCL1 expression and neutrophil recruitment to the lung in mice infected with influenza A virus. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 19, n. 4, p. 1103–1111, abr. 2021.
- BAN, J. et al. Human Respiratory Syncytial Virus NS 1 Targets TRIM25 to Suppress RIG-I Ubiquitination and Subsequent RIG-I-Mediated Antiviral Signaling. **Viruses**, v. 10, n. 12, p. 716, 14 dez. 2018.
- BARBER, G. N. Host defense, viruses and apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 8, n. 2, p. 113–126, 17 fev. 2001.
- BARTHOLD, S. W.; SMITH, A. L. **Mouse Hepatitis Virus**. [s.l: s.n.].
- BLEAU, C. et al. Toll-like receptor-2 exacerbates murine acute viral hepatitis. **Immunology**, v. 149, n. 2, p. 204–224, out. 2016.
- BOUTELL, C.; SADIS, S.; EVERETT, R. D. Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein ICP0 and Its Isolated RING Finger Domain Act as Ubiquitin E3 Ligases In Vitro. **Journal of Virology**, v. 76, n. 2, p. 841–850, 15 jan. 2002.
- BRACQUEMOND, D.; MURIAUX, D. Betacoronavirus Assembly: Clues and Perspectives for Elucidating SARS-CoV-2 Particle Formation and Egress. **mBio**, v. 12, n. 5, 26 out. 2021.
- BROWN, J. et al. TLR-signaling Networks. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 4, p. 417–427, 12 abr. 2011.
- BUTT, Y.; KURDOWSKA, A.; ALLEN, T. C. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 140, n. 4, p. 345–350, 1 abr. 2016.
- CAO, Y.; ZHANG, L. A Smurf1 tale: Function and regulation of an ubiquitin ligase in multiple cellular networks. **Cellular and Molecular Life Sciences**, jul. 2013.

- CHAN, J. F.-W. et al. Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility. **Clinical Infectious Diseases**, 26 mar. 2020.
- CHENG, P. L. et al. Phosphorylation of E3 ligase smurf1 switches its substrate preference in support of axon development. **Neuron**, v. 69, n. 2, p. 231–243, 2011.
- CHOI, Y.; BOWMAN, J. W.; JUNG, J. U. Autophagy during viral infection — a double-edged sword. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 341–354, 19 jun. 2018.
- COLLINS, A. C. et al. Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune DNA Sensor for Mycobacterium tuberculosis. **Cell Host & Microbe**, v. 17, n. 6, p. 820–828, jun. 2015.
- CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2 abr. 2020.
- DESHAIES, R. J.; JOAZEIRO, C. A. P. RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 399–434, 1 jun. 2009.
- DIAMOND, M. S.; KANNEGANTI, T.-D. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. **Nature Immunology**, v. 23, n. 2, p. 165–176, 1 fev. 2022.
- DONG, E.; DU, H.; GARDNER, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 533–534, maio 2020.
- EZEONWUMELU, I. J.; GARCIA-VIDAL, E.; BALLANA, E. JAK-STAT Pathway: A Novel Target to Tackle Viral Infections. **Viruses**, v. 13, n. 12, p. 2379, 27 nov. 2021.
- FEI, C. et al. Smurf1-mediated Axin ubiquitination requires Smurf1 C2 domain and is cell cycle-dependent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 20, p. 14170–14177, 2014.
- FEST, J. et al. The neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with mortality in the general population: The Rotterdam Study. **European Journal of Epidemiology**, v. 34, n. 5, p. 463–470, 19 maio 2019.
- FRANCO, L. H. et al. The Ubiquitin Ligase Smurf1 Functions in Selective Autophagy of Mycobacterium tuberculosis and Anti-tuberculous Host Defense. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 1, p. 59–72, jan. 2017.
- FUKUI, S. et al. Predictive prognostic biomarkers in patients with COVID-19 infection. **Molecular Medicine Reports**, v. 27, n. 1, p. 15, 30 nov. 2022.

GACK, M. U. et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. **Nature**, v. 446, n. 7138, p. 916–920, 28 abr. 2007.

GARCIA, A. B. et al. Coding-Complete Genome Sequence of Murine Hepatitis Virus Strain 3 from Brazil. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 15, 15 abr. 2021.

GU, H.; JAN FADA, B. Specificity in Ubiquitination Triggered by Virus Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4088, 8 jun. 2020.

HAN, Z. et al. Ubiquitin Ligase WWP1 Interacts with Ebola Virus VP40 To Regulate Egress. **Journal of Virology**, v. 91, n. 20, 15 out. 2017.

HARING, J. Mouse hepatitis virus. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 462–466, 1 ago. 2001.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100–1115, dez. 2020.

HERSHKO, A. et al. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 13, p. 8206–8214, jul. 1983.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. THE UBIQUITIN SYSTEM. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 425–479, jun. 1998.

HIRAI, A. et al. Role of Mouse Hepatitis Virus (MHV) Receptor Murine CEACAM1 in the Resistance of Mice to MHV Infection: Studies of Mice with Chimeric mCEACAM1a and mCEACAM1b. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6654–6666, jul. 2010.

HORVAT, J. C. et al. Neonatal Chlamydial Infection Induces Mixed T-Cell Responses That Drive Allergic Airway Disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 176, n. 6, p. 556–564, 15 set. 2007.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, fev. 2020.

HUIBREGTSE, J. M. et al. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 7, p. 2563–2567, 28 mar. 1995.

JIANG, X.; CHEN, Z. J. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 1, p. 35–48, 9 jan. 2012.

JOHANSSON, C.; KIRSEBOM, F. C. M. Neutrophils in respiratory viral infections. **Mucosal Immunology**, v. 14, n. 4, p. 815–827, jul. 2021.

KARKI, R. et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. **Cell**, v. 184, n. 1, p. 149–168.e17, jan. 2021.

KARKI, R. et al. ZBP1-dependent inflammatory cell death, PANoptosis, and cytokine storm disrupt IFN therapeutic efficacy during coronavirus infection. **Science Immunology**, 19 maio 2022.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 25 set. 2014.

KIM, T.; LEE, J. S.; JU, Y. S. Experimental Models for SARS-CoV-2 Infection. **Molecules and Cells**, v. 44, n. 6, p. 377–383, 30 jun. 2021.

KÖRNER, R. et al. Of Mice and Men: The Coronavirus MHV and Mouse Models as a Translational Approach to Understand SARS-CoV-2. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 880, 12 ago. 2020.

LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 270–284, 30 maio 2022.

LEE, Y. S. et al. Smad6-specific recruitment of Smurf E3 ligases mediates TGF- β 1-induced degradation of MyD88 in TLR4 signalling. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, p. 460, 6 set. 2011.

LI, S. et al. Ubiquitin ligase Smurf1 targets TRAF family proteins for ubiquitination and degradation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 338, n. 1–2, p. 11–17, 24 maio 2010.

LI, S.-W. et al. SARS Coronavirus Papain-Like Protease Inhibits the TLR7 Signaling Pathway through Removing Lys63-Linked Polyubiquitination of TRAF3 and TRAF6. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 678, 5 maio 2016.

LI, X. et al. SARS-CoV-2 ORF10 suppresses the antiviral innate immune response by degrading MAVS through mitophagy. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 19, n. 1, p. 67–78, 29 jan. 2022.

LI, Z. et al. The E3 ligase RNF5 restricts SARS-CoV-2 replication by targeting its envelope protein for degradation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 53, 3 fev. 2023.

LIN, D. et al. Induction of USP25 by viral infection promotes innate antiviral responses by mediating the stabilization of TRAF3 and TRAF6. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 36, p. 11324–11329, 8 set. 2015.

LIU. The granulocyte/lymphocyte ratio as an independent predictor of tumour growth, metastasis and progression: Its clinical applications. **Molecular Medicine Reports**, 2008.

LONG, E. et al. COVID-19 pandemic and its impact on social relationships and health. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 76, n. 2, p. 128–132, fev. 2022.

LU, K. et al. Pivotal role of the C2 domain of the smurf1 ubiquitin ligase in substrate selection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 19, p. 16861–16870, 2011.

LUTZ, C. et al. COVID-19 preclinical models: human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. **Human Genomics**, v. 14, n. 1, p. 20, 4 dez. 2020.

MALLETTE, F. A.; RICHARD, S. K48-linked ubiquitination and protein degradation regulate 53BP1 recruitment at DNA damage sites. **Cell Research**, v. 22, n. 8, p. 1221–1223, 2012.

MALONE, B. et al. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 21–39, 25 jan. 2022.

MATTHAY, M. A.; WARE, L. B.; ZIMMERMAN, G. A. The acute respiratory distress syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 8, p. 2731–2740, 1 ago. 2012.

MEDETALIBEYOGLU, A. et al. The effect of liver test abnormalities on the prognosis of COVID-19. **Annals of Hepatology**, v. 19, n. 6, p. 614–621, nov. 2020.

MI, Y. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 virus-like particles induce dendritic cell maturation and modulate T cell immunity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 9 nov. 2022.

MIESBACH, W.; MAKRIS, M. COVID-19: Coagulopathy, Risk of Thrombosis, and the Rationale for Anticoagulation. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 26, 1 jan. 2020.

MUND, T.; PELHAM, H. R. B. Control of the activity of WW-HECT domain E3 ubiquitin ligases by NDFIP proteins. **EMBO reports**, v. 10, n. 5, p. 501–507, 3 maio 2009.

NAUMENKO, V. et al. Neutrophils in viral infection. **Cell and Tissue Research**, v. 371, n. 3, p. 505–516, 11 mar. 2018.

NOVELLI, G. et al. Inhibition of HECT E3 ligases as potential therapy for COVID-19. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 4, p. 310, 24 abr. 2021.

O'BRIEN, V. Viruses and apoptosis. **Journal of General Virology**, v. 79, n. 8, p. 1833–1845, 1 ago. 1998.

OHTAKE, F. et al. The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- κ B Signaling. **Molecular Cell**, v. 64, n. 2, p. 251–266, 2016.

OKAMOTO, M. et al. Recognition of Viral RNA by Pattern Recognition Receptors in the Induction of Innate Immunity and Excessive Inflammation During Respiratory Viral Infections. **Viral Immunology**, v. 30, n. 6, p. 408–420, jul. 2017.

ORVEDAHL, A. et al. Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. **Nature**, v. 480, n. 7375, p. 113–117, 1 dez. 2011.

PAROTTO, M. et al. Post-acute sequelae of COVID-19: understanding and addressing the burden of multisystem manifestations. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 11, n. 8, p. 739–754, ago. 2023.

PAUL, P.; MÜNZ, C. Autophagy and Mammalian Viruses. Em: [s.l: s.n.], p. 149–195.

PENG, Z.; YUE, Y.; XIONG, S. Mycobacterial PPE36 Modulates Host Inflammation by Promoting E3 Ligase Smurf1-Mediated MyD88 Degradation. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 14 fev. 2022.

PEREIRA, R. DAS D. et al. A 5-Lipoxygenase Inhibitor, Zileuton, Modulates Host Immune Responses and Improves Lung Function in a Model of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Induced by Betacoronavirus. **Viruses**, v. 15, n. 10, p. 2049, 4 out. 2023.

PIMENTA, J. C. et al. **Neuropsychiatric sequelae in an experimental model of post-COVID syndrome in mice.** , 10 jan. 2024.

QIAN, G. et al. Smurf1 restricts the antiviral function mediated by USP25 through promoting its ubiquitination and degradation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 498, n. 3, p. 537–543, abr. 2018.

RAJSBAUM, R. et al. Species-Specific Inhibition of RIG-I Ubiquitination and IFN Induction by the Influenza A Virus NS1 Protein. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 11, p. e1003059, 29 nov. 2012.

RANDO, H. M. et al. Pathogenesis, Symptomatology, and Transmission of SARS-CoV-2 through Analysis of Viral Genomics and Structure. **mSystems**, v. 6, n. 5, 26 out. 2021.

ROTIN, D.; KUMAR, S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 6, p. 398–409, 13 jun. 2009.

SEN, B. B. et al. Neutrophil to lymphocyte ratio as a measure of systemic inflammation in psoriasis. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 223–227, 22 set. 2014.

SETH, R. B.; SUN, L.; CHEN, Z. J. Antiviral innate immunity pathways. **Cell Research**, v. 16, n. 2, p. 141–147, 13 fev. 2006.

SHI, C.-S. et al. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-9b Suppresses Innate Immunity by Targeting Mitochondria and the MAVS/TRAF3/TRAF6 Signalingosome. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 6, p. 3080–3089, 15 set. 2014.

SHRUM, B. et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 233, 12 dez. 2014.

SIMADIBRATA, D. M. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio on admission to predict the severity and mortality of COVID-19 patients: A meta-analysis. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 42, p. 60–69, abr. 2021.

SIR, D.; JAMES OU, J. Autophagy in Viral Replication and Pathogenesis. **Molecules and Cells**, v. 29, n. 1, p. 1–8, jan. 2010.

SOUZA-COSTA, L. P. et al. Uncovering new insights into the role of the ubiquitin ligase Smurf1 on the regulation of innate immune signaling and resistance to infection. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 9 maio 2023.

SUI, L. et al. SARS-CoV-2 Membrane Protein Inhibits Type I Interferon Production Through Ubiquitin-Mediated Degradation of TBK1. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 18 maio 2021.

SUN, L. et al. Coronavirus Papain-like Proteases Negatively Regulate Antiviral Innate Immune Response through Disruption of STING-Mediated Signaling. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30802, 1 fev. 2012.

TANG, N. et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 5, p. 1094–1099, 27 maio 2020.

TERPOS, E. et al. Hematological findings and complications of COVID-19. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 7, p. 834–847, 23 jul. 2020.

THEOBALD, S. J. et al. Long-lived macrophage reprogramming drives spike protein-mediated inflammasome activation in COVID-19. **EMBO Molecular Medicine**, v. 13, n. 8, 9 ago. 2021.

VABRET, N. et al. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. **Immunity**, v. 52, n. 6, p. 910–941, jun. 2020.

VALERO, R. et al. USP25, a Novel Gene Encoding a Deubiquitinating Enzyme, Is Located in the Gene-Poor Region 21q11.2. **Genomics**, v. 62, n. 3, p. 395–405, dez. 1999.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155–170, 28 mar. 2021.

WANG, G. et al. PLP2 of Mouse Hepatitis Virus A59 (MHV-A59) Targets TBK1 to Negatively Regulate Cellular Type I Interferon Signaling Pathway. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17192, 18 fev. 2011.

WANG, M. et al. ATR/Chk1/Smurf1 pathway determines cell fate after DNA damage by controlling RhoB abundance. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

WANG, X. et al. Ubiquitination of Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 4 (TRAF4) by Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1 (Smurf1) Regulates Motility of Breast Epithelial and Cancer Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 30, p. 21784–21792, jul. 2013.

WANG, Y.; TONG, X.; YE, X. Ndfip1 Negatively Regulates RIG-I–Dependent Immune Signaling by Enhancing E3 Ligase Smurf1-Mediated MAVS Degradation. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 11, p. 5304–5313, 1 dez. 2012.

WANG, Z. et al. Role of innate immunity in SARS-CoV-2 infection. **Biosafety and Health**, v. 5, n. 5, p. 280–288, out. 2023.

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 12 mar. 2020a.

WU, Y. et al. Incidence, risk factors, and prognosis of abnormal liver biochemical tests in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. **Hepatology International**, v. 14, n. 5, p. 621–637, 24 set. 2020b.

WULANINGSIH, W. et al. Associations of C-Reactive Protein, Granulocytes and Granulocyte-to-Lymphocyte Ratio with Mortality from Breast Cancer in Non-Institutionalized American Women. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157482, 13 jun. 2016.

YAMASHITA, M. et al. Ubiquitin Ligase Smurf1 Controls Osteoblast Activity and Bone Homeostasis by Targeting MEKK2 for Degradation. **Cell**, v. 121, n. 1, p. 101–113, abr. 2005.

YANG, W. et al. Delicate regulation of IL-1 β -mediated inflammation by cyclophilin A. **Cell Reports**, v. 38, n. 11, p. 110513, mar. 2022.

YANG, Z. et al. Coronavirus MHV-A59 infects the lung and causes severe pneumonia in C57BL/6 mice. **Virologica Sinica**, v. 29, n. 6, p. 393–402, 22 dez. 2014.

YAO, X. et al. Aftermath on COVID-19 technological and socioeconomic changes: A meta-analytic review. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 202, p. 123322, maio 2024.

YUAN, C. et al. Smurf1 protein negatively regulates interferon- γ signaling through promoting STAT1 protein ubiquitination and degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 21, p. 17006–17015, 2012a.

YUAN, C. et al. Smurf1 Protein Negatively Regulates Interferon- γ Signaling through Promoting STAT1 Protein Ubiquitination and Degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 21, p. 17006–17015, maio 2012b.

ZHANG, H.-L. et al. West Nile Virus NS1 Antagonizes Interferon Beta Production by Targeting RIG-I and MDA5. **Journal of Virology**, v. 91, n. 18, 15 set. 2017.

ZHANG, L. et al. Induction of OTUD1 by RNA viruses potently inhibits innate immune responses by promoting degradation of the MAVS/TRAF3/TRAF6 signalosome. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 5, p. e1007067, 7 maio 2018.

ZHAO, F. et al. SARS-CoV-2 Infection and Lung Regeneration. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 35, n. 2, 20 abr. 2022.

ZHENG, J. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Induced Immune Activation and Death of Monocyte-Derived Human Macrophages and Dendritic Cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 223, n. 5, p. 785–795, 3 mar. 2021.

ANEXOS

ANEXO A – Trabalhos publicados referentes à tese



Article

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

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

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

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

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

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

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



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

Academic Editor: Luis Martinez-Sobrido

Received: 16 August 2024

Revised: 27 September 2024

Accepted: 1 October 2024

Published: 3 October 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

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

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

1. Introduction

Betacoronavirus is a genus that belongs to the *Coronaviridae* family of viruses, and it includes enveloped viruses with single-stranded, positive-sense RNA. This genus comprises a vast number of members that cause zoonotic and human illnesses, ranging from the common cold to the highly severe acute respiratory coronavirus disease 2019 (COVID-19), responsible for the recent pandemic that led to nearly 7 million deaths [1]. Given the wide geographic distribution of Betacoronaviruses, the recurrence of zoonotic outbreaks, and the potential for



OPEN ACCESS

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

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

*CORRESPONDENCE
Luis Henrique Franco
✉ luisfranco@icb.ufmg.br

†These authors have contributed
equally to this work

RECEIVED 13 March 2023

ACCEPTED 28 March 2023

PUBLISHED 09 May 2023

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

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

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

Luiz Pedro Souza-Costa^{1†}, Josiane Teixeira Andrade-Chaves^{1†},
Juvana Moreira Andrade¹, Vivian Vasconcelos Costa²
and Luis Henrique Franco^{1*}

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

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

KEYWORDS

ubiquitin ligase, ubiquitination, Smurf1, innate immunity, infection

1 Introduction

The innate immune system is the first line of defense against microbial infections. In addition to chemical and physical components, innate immunity is composed of cells such as macrophages, dendritic cells, and neutrophils, which sense the presence of infectious pathogens and activate inflammatory responses required for their elimination. The

ANEXO B – Trabalhos publicados em colaboração

Trends in
Microbiology

CellPress

Review

Bag it, tag it: ubiquitin ligases and host resistance to *Mycobacterium tuberculosis*Priscila C. Campos ¹, Danielle T. Cunha ², Luiz P. Souza-Costa ², Michael U. Shiloh ^{1,3,*} and Luis H. Franco ^{2,*}

Infection with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the etiological agent of tuberculosis (TB), remains a significant global epidemic. Host resistance to Mtb depends on both adaptive and innate immunity mechanisms, including development of antigen-specific CD4 and CD8 T cells, production of inflammatory cytokines, bacterial phagocytosis and destruction within phagolysosomes, host cell apoptosis, and autophagy. A key regulatory mechanism in innate immunity is the attachment of the small protein ubiquitin to protein and lipid targets by the enzymatic activity of ubiquitin ligases. Here, we summarize the latest advances on the role of ubiquitination and ubiquitin ligases in host immunity against Mtb, with a focus on innate immunity signaling, inflammation, and antimicrobial autophagy. Understanding how ubiquitin ligases mediate immunity to Mtb, and the specific substrates of distinct ubiquitin ligases in the context of Mtb infection, could facilitate development of new host-directed antimicrobials.

Highlights

Ubiquitination, a cellular process mediated by ubiquitin ligases, and ubiquitin-derived antimicrobial peptides regulate host resistance against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).

Ubiquitin ligases TRIM27 and ligand of numb protein X1 (LNX1) fine-tune host innate immune signaling and macrophage apoptosis in response to mycobacterial infection.

Ubiquitin ligases Parkin, SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 (Smurf1), and neuronal precursor cell expressed, developmentally downregulated 4

Inflammation Research (2024) 73:2009–2022
<https://doi.org/10.1007/s00011-024-01948-8>

Inflammation Research

ORIGINAL RESEARCH PAPER



Angiotensin-(1–7) decreases inflammation and lung damage caused by betacoronavirus infection in mice

Erick Bryan de Sousa Lima^{1,2} · Antônio Felipe S. Carvalho^{1,2} · Isabella Zaidan³ · Adelson Héric A. Monteiro³ · Camila Cardoso³ · Edvaldo S. Lara¹ · Fernanda S. Carneiro¹ · Leonardo C. Oliveira⁴ · Filipe Resende⁵ · Felipe Rocha da Silva Santos⁴ · Luiz Pedro Souza-Costa⁴ · Ian de Meira Chaves⁵ · Celso M. Queiroz-Junior⁵ · Remo C. Russo⁶ · Robson A. S. Santos⁷ · Luciana P. Tavares⁸ · Mauro M. Teixeira⁴ · Vivian V. Costa⁵ · Lirlândia P. Sousa^{1,3}

Received: 4 June 2024 / Revised: 30 August 2024 / Accepted: 10 September 2024 / Published online: 18 September 2024
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2024

Article

A 5-Lipoxygenase Inhibitor, Zileuton, Modulates Host Immune Responses and Improves Lung Function in a Model of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Induced by *Betacoronavirus*

Rafaela das Dores Pereira ¹, Rayane Aparecida Nonato Rabelo ¹, Natália Fernanda de Melo Oliveira ¹, Samuel Luiz Teixeira Porto ¹, Ana Claudia dos Santos Pereira Andrade ² , Celso M. Queiroz-Junior ², César Luís Nascimento Barbosa ^{1,3}, Luiz Pedro de Souza-Costa ¹ , Felipe Rocha da Silva Santos ¹ , Fernando Bento Rodrigues Oliveira ¹, Bárbara Luísa Vieira da Silva ², Hanna L. Umezu ⁴, Raquel Ferreira ¹, Glauber S. F. da Silva ⁴, Jader Santos Cruz ¹ , Mauro Martins Teixeira ¹ , Vivian Vasconcelos Costa ^{2,*} and Fabiana Simão Machado ^{1,3,*} 

Inflammation Research (2023) 72:2073–2088
<https://doi.org/10.1007/s00011-023-01798-w>

Inflammation Research

ORIGINAL RESEARCH PAPER



A suitable model to investigate acute neurological consequences of coronavirus infection

Jordane Pimenta ¹ · Bruna Da Silva Oliveira ¹ · Anna Luíza Diniz Lima ³ · Caroline Amaral Machado ¹ · Larisse De Souza Barbosa Lacerda ¹ · Leonardo Rossi ¹ · Celso Martins Queiroz-Junior ¹ · Luiz Pedro De Souza-Costa ⁵ · Ana Claudia Santos Pereira Andrade ¹ · Matheus Rodrigues Gonçalves ⁶ · Bárbara Mota ¹ · Fernanda Martins Marim ² · Renato Santana Aguiar ² · Pedro Pires Goulart Guimarães ³ · Antônio Lúcio Teixeira ⁴ · Luciene Bruno Vieira ³ · Cristina Guatimosim ¹ · Mauro Martins Teixeira ⁵ · Aline Silva De Miranda ¹ · Vivian Vasconcelos Costa ¹

Received: 2 June 2023 / Revised: 6 September 2023 / Accepted: 13 September 2023 / Published online: 14 October 2023
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2023



Brain Behavior and Immunity <em@editorialmanager.com>
 para mim ▾

sex., 22 de dez. de 2023, 15:24 ☆ ☺ ↶ ⋮

This is an automated message.

Journal: Brain Behavior and Immunity
 Title: Neuropsychiatric sequelae in an experimental model of post-COVID syndrome in mice.
 Corresponding Author: Dr. Vivian Costa
 Co-Authors: Jordane Clarisse Pimenta; Vinicius Amorim Beltrami; Bruna Da Silva Oliveira; Celso Martins Queiroz-Junior; Jéssica Barsalini; Danielle Cunha Teixeira; Luiz Pedro de Souza-Costa; Anna Luíza Diniz Lima; Caroline Amaral Machado; Bárbara Zuccolotto Schneider Guimarães Parreira; Felipe Rocha da Silva Santos; Pedro Augusto Carvalho Costa; Larisse De Souza Barbosa Lacerda; Matheus Rodrigues Gonçalves; Ian de Meira Chaves; Manoela Gonzaga Gontijo Do Couto; Victor Rodrigues de Melo Costa; Natália Ribeiro Cabacinha Nóbrega; Bárbara Luísa Silva; Talita Fonseca; Filipe Resende; Natália Teixeira Wnuk; Hanna L. Umezu; Gabriel Campolina-Silva; Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade; Renato Santana de Aguiar; Guilherme Mattos Jardim Costa; Pedro Pires Goulart Guimarães; Glauber Santos Ferreira da Silva; Luciene Bruno Vieira; Vanessa Pinho; Antônio Lúcio Teixeira; Mauro Martins Teixeira; Aline Silva De Miranda
 Manuscript Number:

Dear Luiz Pedro de Souza-Costa,

The corresponding author Dr. Vivian Costa has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Brain Behavior and Immunity.

Submission Title: Neuropsychiatric sequelae in an experimental model of post-COVID syndrome in mice.

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Confirm co-authorship of submission to Brain Behavior and Immunity

Caixa de entrada x Avast: Safe x





Brain Behavior and Immunity <em@editorialmanager.com>
para mim

qui., 19 de dez. de 2024, 12:54



This is an automated message.

Journal: Brain Behavior and Immunity
Title: PI3Kγ pathway contributes to neuroinflammation and neuronal death induced by Zika virus infection
Corresponding Author: Dr. Vivian Costa
Co-Authors: Danielle Cunha Teixeira; Gabriel Campolina-Silva; Fernanda Martins Marim; Felipe Rocha Santos; Celso Martins Queiroz-Junior; Pedro Augusto Carvalho Costa; Fernanda Lima Tana; Luiz Pedro Souza-Costa; Jordane Clarisse Pimenta; Júlia Gomes Carvalho; Vinícius Beltrami; Felipe Emanuel Oliveira Rocha; Drielle Viana Vieira; Evandro Gonçalves Dornelas; Giovana Cougo Ferreira; Felipe Ferraz Dias; Pedro Pires Goulart Guimarães; Vinícius Toledo Ribas; Antonio Lucio Teixeira; Aline Silva de Miranda; Mauro Martins Teixeira; Danielle Glória Souza
Manuscript Number:

Dear Luiz Pedro Souza-Costa,

The corresponding author Dr. Vivian Costa has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Brain Behavior and Immunity.

Submission Title: PI3Kγ pathway contributes to neuroinflammation and neuronal death induced by Zika virus infection