

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

**A relação entre o adaptador imunológico MYD88 e a glicosilação de proteínas**

**Joyce Silva Saad**

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Giuseppe Palmisano  
Coorientador: Prof. Dr. Claudio R. F. Marinho

São Paulo  
2020

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Jesus Cristo por ter me ajudado a chegar até aqui. Foi um caminho longo, difícil e estressante, mas finalmente consegui alcançar meu objetivo.

Aos meus pais, em especial minha mãe, por sempre me incentivar a continuar estudando e a nunca desistir.

Ao Prof. Giuseppe Palmisano pela oportunidade de realizar esse projeto e por ter sido um professor paciente, compreensível e muito amigo.

Aos colegas do GPLab e especialmente à Lívia e à Verônica que contribuíram diretamente para execução desse projeto.

Agradeço também ao Laboratório do Prof. Dr. Cláudio Marinho que junto com o Prof. Giuseppe idealizaram a ideia desse projeto. E um agradecimento especial à Érika e ao Oscar que auxiliaram na retirada e no processamento dos órgãos dos camundongos.

Por fim agradeço ao Laboratório do Prof. Dr. Martin R. Larsen pelo processamento das amostras e pelo uso do Espectrômetro de Massas.

## RESUMO

Saad, J. S. A relação entre o adaptador imunológico MYD88 e a glicosilação de proteínas. 2020. 45. f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O MYD88 é um adaptador canônico envolvido em vias de sinalização inflamatória como a sinalização de receptores do tipo Toll-like em mamíferos e a sinalização de IL-1R, assim ativando NF- $\kappa$ B e produzindo citocinas pró-inflamatórias. Estudos mostram que a deficiência desse adaptador gera falhas na resposta imune do organismo diminuindo a produção de sinais químicos e biológicos impedindo uma resposta inflamatória que gera suscetibilidade a diversas doenças. Outro fator também envolvido em falhas na resposta da imunidade inata e adaptativa é a glicosilação de proteínas. Além de proteger as proteínas contra ações proteolíticas e modularem importantes eventos biológicos, quase todas as moléculas-chave envolvidas (receptores, imunoglobulinas, citocinas, lectinas, etc.) são glicosiladas, e suas glicofomas específicas estão envolvidas em eventos de reconhecimento e se encontram alteradas em diversas enfermidades. Uma vez que, tanto a ausência do adaptador MYD88 quanto a glicosilação de proteínas estão envolvidos no desenvolvimento de diversas doenças, este estudo tem como objetivo verificar a influência do MYD88 na expressão de proteínas e glicoproteínas, comparando três órgãos: baço, cérebro e timo de camundongos selvagens e MYD88 *knockout*. Para tanto, foram utilizadas técnicas de proteômica e glicoproteômica que possuem como ferramenta central a espectrometria de massas. Como resultado foram identificadas um total de 4270 proteínas e 653 glicoproteínas únicas. Diferenças expressivas entre o grupo selvagem e deficiente em MYD88 não foram encontradas ao nível proteico. No entanto ao analisar as modificações pós-tradicionais, diferenças foram encontradas, mostrando que a ausência do adaptador pode interferir na forma como essas proteínas são glicosiladas.

Palavras-chave: MYD88, Glicoproteômica, Glicosilação, Ácido Siálico, Fucose, Sistema Imune, Espectrometria de Massas.

## ABSTRACT

Saad, J. S. The relationship between the immune adapter MYD88 and proteins glycosylation.2020. 45. f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

MYD88 is a canonical adapter involved in inflammatory signaling pathways such as signaling of Toll-like receptors in mammals and the signaling of IL-1R, activating NF-κB and producing pro-inflammatory cytokines. Studies show that the deficiency of this adapter causes failures in immune response, decreasing the production of chemical and biological signals, preventing an inflammatory response generating susceptibility to several diseases. Another factor also involved with failures in the response of innate and adaptive immunity is the glycosylation of proteins. In addition to protecting proteins against proteolytic actions and modulating important biological events, almost all of the key molecules involved (receptors, immunoglobulins, cytokines, lectins, etc.) are glycosylated and their specific glycoforms are involved in recognition events and are altered in several diseases. Since both the absence of the MYD88 adapter and protein glycosylation are involved in the development of several diseases, this study aims to verify the influence of MYD88 on the expression of proteins and glycoproteins, comparing 3 organs: spleen, brain and thymus of mice wild type and MYD88 *knockout*. For this purpose, proteomics and glycoproteomics techniques were used, which have mass spectrometry as the central tool. As a result, a total of 4270 unique proteins and 653 unique glycoproteins were identified. Expressive differences between the wild type and MYD88-deficient group were not found at the protein level, however when analyzing post-translational modifications, differences were found showing that the absence of the adapter may interfere with the way these proteins are glycosylated.

**KEYWORDS:** MYD88, Glycoproteomics, Glycosylation, Sialic Acid, Fucose, Immune System, Mass Spectrometry

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	5
1.1 A Importância do adaptador MYD88 .....	7
1.2 A importância da glicosilação em proteínas .....	8
1.3 Relação entre glicosilação de proteínas e doenças .....	10
2. OBJETIVOS .....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Animais .....	13
3.2 Perfusão e coleta de órgãos .....	13
3.3 Extração e digestão de proteínas para análise por espectrometria de massas ....	14
3.4 Enriquecimento de glicopeptídeos .....	14
3.5 Análise por espectrometria de massas (MS/MS) .....	14
3.6 Busca em banco de dados e análise bioinformática .....	15
4. RESULTADOS .....	18
4.1 Análise proteômica comparativa dos órgãos baço, cérebro e timo em camundongos deficientes para MYD88 e selvagens. ....	18
4.2 Análise glicoproteômica comparativa dos órgãos baço, cérebro e timo em camundongos <i>Knockout</i> para MYD88 e selvagens .....	21
5. DISCUSSÃO .....	28
5.1 Glicanos complexos .....	31
5.2 Fucosilação .....	31
5.3 Sialilação.....	33
6.CONCLUSÃO.....	35
7.REFERENCIAS.....	36
ANEXO.....	44

## 1. INTRODUÇÃO

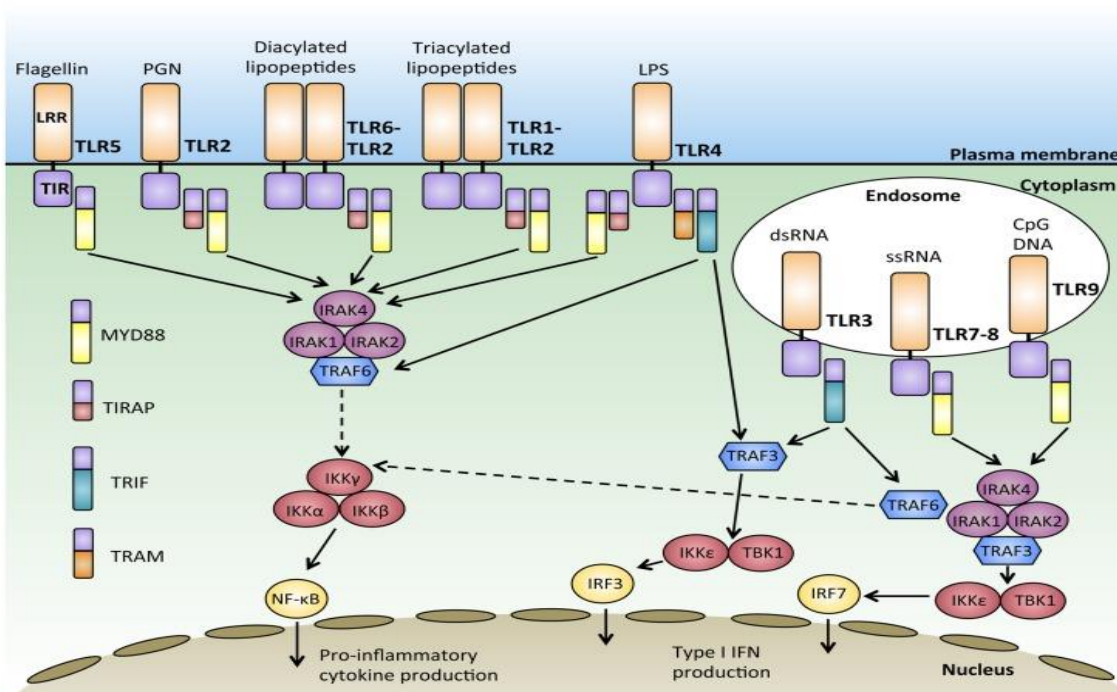
A proteína MYD88, fator de diferenciação mielóide88, é um adaptador canônico envolvido em vias de sinalização inflamatória (DEGUINE; BARTON, 2014). Foi descrito pela primeira vez em 1990 como um gene regulado positivamente durante a diferenciação mielóide induzido pela interleucina 6 (IL-6) (LORD et al., 1990). Está envolvido na sinalização do receptor de interleucina 1 (IL-1R) e receptores do tipo Toll-like (TLR) de mamíferos (MUZIO et al., 1997; MEDZHITOV et al., 1998). A proteína MYD88 está dividida em três domínios principais: o domínio C-terminal TIR (Toll IL-1R) que medeia a interação com outras proteases contendo o domínio TIR (receptores ou adaptadores), o domínio de morte N-terminal (DD) associado aos membros da família IRAK (MUZIO et al., 1997; BURNS et al., 1998; MEDZHITOV et al., 1998) e um domínio intermediário (INT) que liga TIR a DD e está envolvido na ativação de IRAK4. A ativação de IRAKs (família de quinases) leva a ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), proteínas quinases ativadas por mitógenos e proteína ativadora 1 (DEGUINE; BARTON, 2014).

Essa sinalização é iniciada por uma alteração conformacional induzida por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) no domínio citoplasmático dos TLRs, que conduz ao recrutamento de MYD88 para o domínio TIR dos TLRs e uma interação TIR-TIR é estabelecida (LEULIER et al., 2000). Na sequência o MYD88 interage com a quinase-4 associada ao receptor IL-1 de serina / treonina (IRAK-4) através dos respectivos domínios de morte (MUZIO et al., 1997; MEDZHITOV et al., 1998; SUZUKI et al., 2002; BURNS et al., 2003). Uma vez que o IRAK4 se liga ao MYD88, ele recruta e fosforila o IRAK-1, que ativa a sua função quinase. A IRAK1 se autofosforila, recrutando o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6) para o complexo MYD88 / IRAK4 / IRAK1. Em seguida, IRAK1 e TRAF6 dissociam-se do complexo receptor e interagem com moléculas adicionais resultando em quinase c-Jun N-terminal (JNK) e inibição da I $\kappa$ B quinase (I $\kappa$ B). Estas proteínas então induzem a ativação da proteína ativadora-1 (AP-1) e NF- $\kappa$ B, levando à transcrição

de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$  (CHEN; GOEDDEL, 2002; HAYDEN; GHOSH, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2005).

Alguns TLRs são ativados somente através da molécula adaptadora MYD88 enquanto para outras é necessário, além do MYD88, o adaptador TIRAP para iniciar a sinalização (DU et al., 2000; CHUANG; ULEVITCH, 2001). Neste caso TLRs e TIRAP atuam como moléculas necessárias para o recrutamento de MYD88 que ativará as TLRs para ativação do sinal de transdução, ativar NF- $\kappa$ B e produzir citocinas pró-inflamatórias (POLTORAK et al., 1998). Durante a ativação de TLR7-8 e TLR9, MYD88 ainda recruta TRAF3 para ativação de TBK1 e IKK $\epsilon$ , que fosforila o fator 7 regulatório de interferon (IRF7) liderando a produção de interferon do tipo 1 (IFN) que está relacionado com a resposta antiviral (HOSHINO et al., 1999; QURESHI et al., 1999; JIANG et al., 2000). A representação dessas vias de ativação pode ser vista na **Figura 1** (WANG et al., 2014).

**Figura 1 - Representação das vias dependentes e independentes de MYD88.**



Fonte: WANG, J.Q. et al. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. Front Immunol, v. 5, p. 367, 2014

## 1.1 A Importância do adaptador MYD88

Camundongos deficientes em MYD88 têm sido amplamente utilizados como modelo para a deficiência de TLR e são suscetíveis a uma grande variedade de patógenos parasitas ou bactérias (SCHNARE et al., 2001; SIVICK et al., 2014).

Um estudo que relaciona o MYD88 e doenças parasitárias investigou a contribuição das respostas imune e inata maternas e fetal no combate à malária placentária através da expressão da proteína adaptadora MYD88. Observou-se que alterações prejudiciais na placenta estavam relacionadas a expressão de MYD88. Camundongos deficientes em MYD88 produzem interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) em quantidades menores quando comparados a camundongos selvagens ressaltando a importância da via de sinalização MYD88 (BARBOZA et al., 2014, 2019).

Outro estudo mostrou que na ausência de MYD88, camundongos não conseguem sinalizar através de membros da família IL-1R. Mutações inativadoras do MYD88 também foram identificadas em humanos com infecções recorrentes por bactérias piogênicas (PICARD et al., 2011). Essas mutações estão associadas à redução da ativação de IRAK4, levando a respostas deficientes através de TLRs e membros da família IL-1. A deleção do MYD88 resulta em uma sinalização incorreta com a produção de citocinas abaixo do esperado para a maioria dos receptores TLRs (KHAN et al., 2004).

O estudo realizado por Oshiumi et al. (2003) mostrou que camundongos deficientes em MYD88 respondiam de forma deficiente a lipopolissacarídeo (LPS), um antígeno que se liga a TLR4 (Adachi et al., 1998; Kawai et al., 1999). A produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por LPS e IL-1 por macrófagos e fibroblastos destes camundongos foi drasticamente diminuída (OSHIUMI et al., 2003). Além disso, células deficientes em MYD88 não respondiam à peptidoglicanos, flagelina, ssRNA ou proteína semelhante a toxoplasma profilina, indicando que a sinalização de TLR2, TLR5, TLR7-8 e TLR9 ocorria exclusivamente através de MYD88 (ADACHI et al., 1998; TAKEDA et al., 2003; BEUTLER et al., 2005; YAROVINSKY et al., 2005). No entanto também evidenciou que embora esta resposta silenciosa tenha protegido os

camundongos deficientes em MYD88 do choque endógeno, as células deficientes em MYD88 mantiveram alguma sinalização residual quando estimuladas com LPS, sugerindo mecanismos de sinalização independentes de MYD88 através de TLR4 (TAKEUCHI et al., 2000; SCANGA et al., 2002). Outros trabalhos também descrevem alguns sinais independentes de MYD88 que podem mediar respostas imunes inatas e adaptativas a patógenos e especialmente a vírus (KHAN et al., 2004). Um exemplo é a maturação de células dendríticas que não é afetada em células *knockout* (KAISHO et al., 2001; HOSHINO et al., 2002) e o estímulo de TLR4 e TLR3 resultando na ativação de IRF3, mesmo na ausência de MYD88, produzindo IFN- $\beta$  e ativação de NF- $\kappa$ B. Essas vias devem compensar a deficiência do adaptador (KHAN et al., 2004).

## 1.2 A importância da glicosilação em proteínas

A modificação de proteínas através da glicosilação é um evento que vai além do genoma, é pós-traducional, e é controlado por muitos fatores que diferem em tipos de células e espécies. Alguns estudos indicam que a glicosilação de proteínas não só protege proteínas contra ações proteolíticas de degradação e desnaturação, mas também interagem diretamente com várias proteínas específicas de carboidratos iniciando ou modulando importantes eventos biológicos. Além disso, interações intramoleculares entre o esqueleto de glicanos e peptídeos afeta a conformação e flexibilidade de ambos modulando a bioatividade de uma proteína glicosilada (SPIRO, 2002).

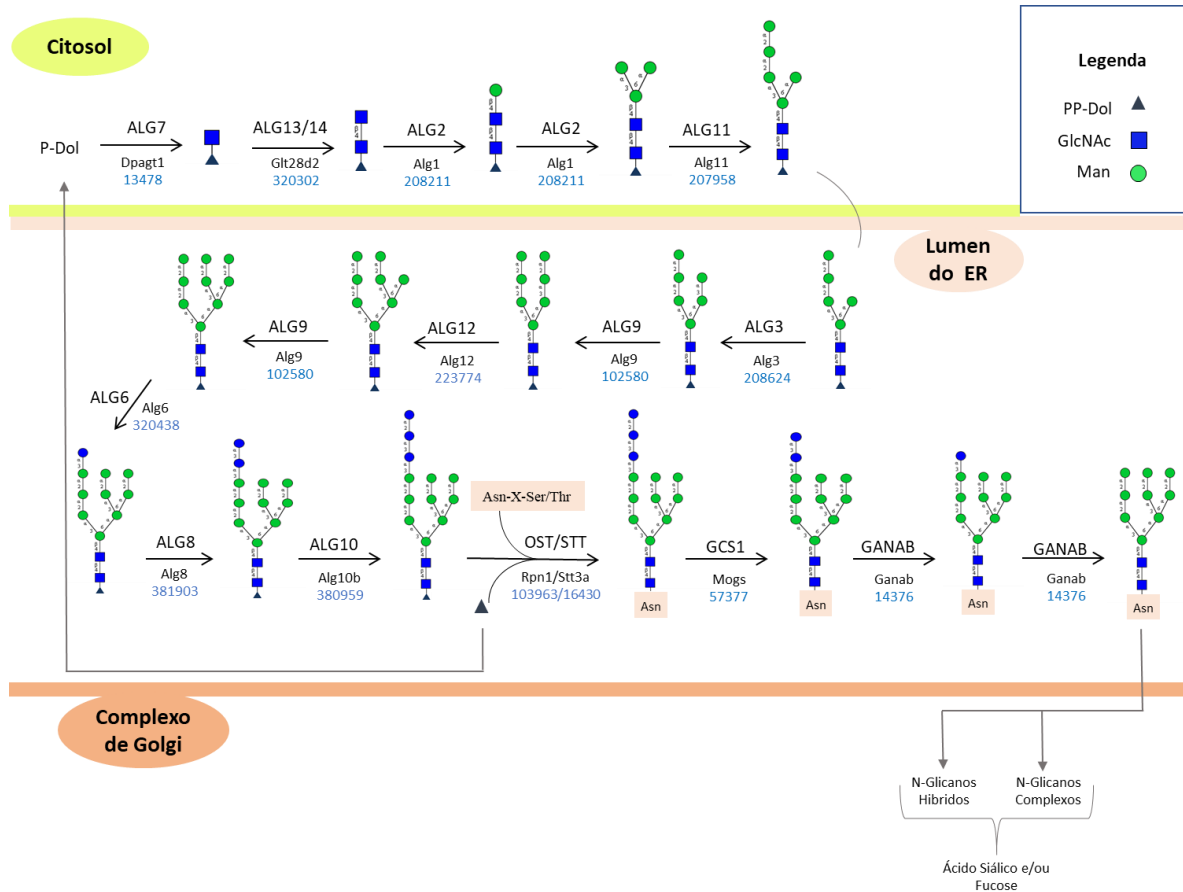
A maioria dos glicanos podem ser classificadas em dois tipos com base em sua ligação a estruturas polipeptídicas: glicosilação ligada a N e glicosilação ligada a O. N-acetilglucosamina (GlcNac) ligada a cadeias laterais de asparagina (Asn) de polipeptídeos formam glicanos ligados a N; enquanto a glicosilação O é iniciada pela adição de N-acetilgalactosamina (GalNac) ligado à O nas cadeias laterais de serina (Ser) ou treonina (Thr), catalisada por uma família de enzimas polipeptídicas N-acetilgalactosaminiltransferases (ppGalNacT) (GERKEN et al., 2011). O local de consenso para a glicosilação ligada a N é composta por 3 resíduos de aminoácidos Asn-X- (Ser/Thr), onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina. Todos os

glicanos ligados a N compartilham um núcleo comum que é composto por Man3GlcNAc2Asn (STEENTOFT et al., 2013).

A glicosilação desempenha um papel no “controle de qualidade” de proteínas sintetizadas. Oligomanosídicos triglicosilado N-glicanos, ligados a proteínas nascentes no retículo endoplasmático (ER), sofrem corte de dois resíduos de glicose e a glicoproteína derivada se liga à chaperoninas do tipo lectina, calnexina e calreticulina, promovendo o dobramento correto de proteínas. Em seguida essas proteínas seguem para o compartimento de Golgi. Proteínas mal dobradas são reglicosiladas e retornam ao ciclo calnexina-calreticulina ou sofrem cortes pela ER-manosidade I e eliminadas por degradação no ER (AEBI et al., 2010; ROTH et al., 2010). A **Figura 2** mostra uma parte da via de glicosilação aqui citada. Entre as proteínas relacionadas à síntese de glicanos, mais ou menos 200 são identificadas como glicosiltransferases, enzimas que catalisam a adição de glicanos a polipeptídeos usando açúcares ligados a nucleotídeos ou lipídios como substratos de doadores ativados (GUO; ABBOTT, 2015).

Além desses processos que envolvem rotas metabólicas, a glicosilação de proteínas tem um grande impacto no sistema imunológico. Quase todas as moléculas-chave envolvidas com a imunidade inata e adaptativa (receptores, imunoglobulinas, citocinas, lectinas, etc.) são glicosiladas e algumas glicofomas específicas estão envolvidas em eventos de reconhecimento (SPIRO, 2002). Relacionado diretamente com MYD88 o estudo realizado por Sato et al. (2017) mostrou que as moléculas OSTC (Complexo Oligossacariltransferase) e Stt3a (subunidade catalítica do Complexo Oligossacariltransferase), importantes componentes da via glicolítica (SHRIMAL; CHEREPANOVA; GILMORE, 2015), são importantes para a expressão de TLR5 e TLR7-9 na superfície celular. O silenciamento dessas moléculas faz com que alguns TLR acabem sendo retidos e degradados no retículo endoplasmático impedindo a sua maturação (SATO et al., 2017).

**Figura 2 - Biossíntese de proteínas N-glicosiladas em camundongo de acordo com o KEGG pathway.**



Fonte: Adaptado de Kawahara et al. Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi* and mass spectrometry-based strategies for glycan and glycoprotein characterization. *In*: Protozoan Parasitism: From Omics to Prevention and Control. [s.l.: s.n.]. GlcNAc: N-acetilglucosamina, Man: Manose, ER: retículo endoplasmático.

### 1.3 Relação entre glicosilação de proteínas e doenças

A glicosilação de proteínas depende de muitos fatores, estando alterada em várias doenças. Alguns exemplos de alterações podem ser observadas na artrite reumatoide (deficiência de galactosilação de IgG), fibrose cística (subsialilação e superfucosilação de glicoconjugados da membrana plasmática), Síndrome de Wiskott-Aldrich. AIDS (expressão de 2 núcleos de O-glicanos em linfócitos T) e outros distúrbios. As alterações mais típicas incluem ramificação aumentada de N-glicanos do tipo complexos, expressão de O-glicanos truncados (Thomsen-Friedenreich),

superexpressão de estruturas de Lewis sialiladas (ligantes de selectina), expressão diferencialmente alteradas das estruturas relacionadas ao grupo sanguíneo ABH, e alterações na sialilação (LISOWSKA, 2008).

Desordens congênitas que afetam sistemas neurológicos e deficiências no desenvolvimento também estão bem definidas em nível molecular (FREEZE; WESTPHAL, 2001; SCHACHTER, 2001). Seis variantes descrevem diferentes estágios da montagem do oligossacarídeo dolicholfosfato como responsável pela deficiência, pois esse lipídio ligado a oligossacarídeos é o glicosil doador na formação de GlcNac- $\beta$ -Asn. Este grupo representa desordens do tipo N-glicosilação.

Becker e Lowe (1999) discutiram a Deficiência de Adesão de Leucócitos II que é uma doença rara caracterizada por infecções recorrentes e severo retardamento mental. A esse distúrbio foi atribuído a falta da formação de GDP-fuc devido a deficiência da atividade de GDP-mannose-4,6-dehidratase (BECKER; LOWE, 1999). A doença hemoglobinúria paraxismal noturna é uma desordem caracterizada pela abundância de complemento mediado por hemólise intravesicular na qual há um defeito na biossíntese nas âncoras de GPI de granulócitos e Linfócitos B (TOMITA, 1999). Sabe-se que o gene que está mutado nessas condições é o PIG-A que está envolvido na adição de GlcNac ao resíduo de fosfatidilinositol (TAKEDA et al., 1993).

Por fim, há um grupo de doenças chamados de transtornos congênitos de glicosilação (CDG) que ocorrem devido a mutações em genes que codificam alguns componentes-chave da maquinaria da glicosilação causando glicosilação defeituosa e mais frequentemente resultando em sintomas clínicos graves (malformação, retardo psicomotor, disfunção de alguns órgãos e outros). Estas doenças mostram a importância da glicosilação de proteínas para o desenvolvimento e funções do organismo (LISOWSKA, 2008).

## 2. OBJETIVOS

Verificar a influência da proteína adaptadora MYD88 na expressão de proteínas e modificações pós-traducionais (glicoproteínas), comparando camundongos selvagem e MYD88<sup>-/-</sup>.

Os objetivos específicos são:

1. Analisar por espectrometria de massa e bioinformática as proteínas extraídas de 3 órgãos: baço, cérebro e timo;
2. Determinar a expressão de diferentes proteínas entre as diferentes condições;
3. Analisar diferenças na modificação pós-traducional glicosilação.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Um número total de 6 camundongos C57BL/6, 3 selvagens e 3 deficientes para MYD88 (MYD88<sup>-/-</sup>) foram criados e mantidos em alojamento convencional e alimentados com dieta regular. Todos os procedimentos estão de acordo com o regulamento nacional de bem-estar e experimentação animal, autorizados pela Comissão Brasileira de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de ética do Instituto de Ciências Biomédicas – USP (Protocolo registrado sob nº 58/2012 para o uso de animais para experimentação). Para o experimento foram utilizados machos adultos, entre 8-10 semanas de idade. Os animais foram sacrificados por dose excessiva de anestésico (quetamina 150mg/Kg e Xilazina 15mg/Kg) via intraperitoneal.

#### **3.2 Perfusão e coleta de órgãos**

A perfusão dos camundongos foi realizada utilizando PBS (*Phosphate Saline Buffer*) com inibidor de protease (#89900, Thermo Fisher) na proporção 2 pastilhas/100mL. Os órgãos, baço, cérebro e timo foram coletados e previamente congelados em *freezer* a -80°C. Após armazenamento de algumas semanas os órgãos foram lavados com solução contendo inibidores de protease e fosfatase (1mM ortoNa, 1mM NaF, 2mM Imidazol, 4mM Tartarato de sódio) em solução de PBS. As proteínas foram extraídas com solução de extração (inibidores de protease, fosfatase e ureia 8M) e por agitação mecânica em tubos CK14 (BioAmerica) contendo microesferas de aço no equipamento Precellys (BioAmerica) em 2 ciclos de 20 segundos). Após a extração as amostras foram centrifugadas 10000gx10min e o sobrenadante retirado.

### **3.3 Extração e digestão de proteínas para análise por espectrometria de massas**

O pellet coletado de cada órgão foi ressuspensionado em 100 µL Ureia 8M contendo *cocktail* de inibidores de protease (1x) e DNase, seguido de 5 ciclos congelamento e descongelamento para total lise das células. Uma alíquota de 1 µL de cada amostra foi retirada para quantificação pelo método Qubit. Em seguida foi adicionado Ambic para concentração final de 50mM, reduzidas com DTT 10 mM (DL-Dithiothreitol – SIGMA), alquiladas com iodo-acetamida 40 mM (GE-Healthcare) e digeridas com tripsina na proporção 1:50 (µg tripsina/µg proteínas) em 50 mM de solução bicarbonato de amônio por 16h a 37°C. A reação foi interrompida com ácido fórmico 1% (pH menor que 2) e dessalinizadas com colunas C18 (StageTips).

### **3.4 Enriquecimento de glicopeptídeos**

Após secagem das amostras, uma parte foi enriquecida por cromatografia líquida por interação hidrofílica (HILIC). Em uma ponteira de 200 µL resina C8 e resina polyLC-HILIC foram adicionadas. A coluna foi ativada e equilibrada com 100 µL 80%ACN/1%TFA e as amostras carregadas e lavadas com 50 µL TFA (0,1%) + 50 µL Ambic 20 mM + 50 µL ACN (50%) (KAWAHARA et al., 2016).

### **3.5 Análise por espectrometria de massas (MS/MS)**

Os peptídeos foram analisados por nano-LC-MS/MS em coluna Reprosil-Pur C18- AQ (3µ; Dr. Maisch GmbH, Alemanha) utilizando Easy-LC nano-HPLC (Proxeon, Odense, Dinamarca) conectados através de uma fonte de íons nanospray (Thermo Scientific) ao espectrômetro de massa Q Exactive™ HF hybrid quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific). O gradiente de HPLC utilizado foi de 0-34% em solvente B (A = 0.1% de ácido fórmico; B = 90% acetonitrila, 0.1% de ácido fórmico), por 70 min em um fluxo de 250 nL/min. A aquisição dependente de dados será feita em modo positivo. O escaneamento de 400-1600 m/z foi registrado no orbitrap numa resolução de 120.000, AGC alvo de  $3 \times 10^6$  e tempo máximo de injeção de 100 ms. Os espectros MS/MS dos

15 peptídeos mais abundantes foram obtidos através de dissociação HCD (*high energy C-trap dissociation*) com aquisição no orbitrap a uma resolução de 30.000. Os parâmetros para a aquisição de HCD foram: janela de isolamento: 1.2 Da; energia de fragmentação: 20/60 (stepped collision energy); Alvo AGC:  $3 \times 10^6$ ; exclusão dinâmica: 30 s; limiar de intensidade:  $3.3 \times 10^6$  e tempo máximo de injeção de 150 ms.

### 3.6 Busca em banco de dados e análise bioinformática

Os arquivos obtidos foram analisados usando dois *softwares* MaxQuant (<http://www.biochem.mpg.de/5111795/maxquant>) e Byonic e pesquisados no banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) utilizando o banco de dados *Mus musculus*.

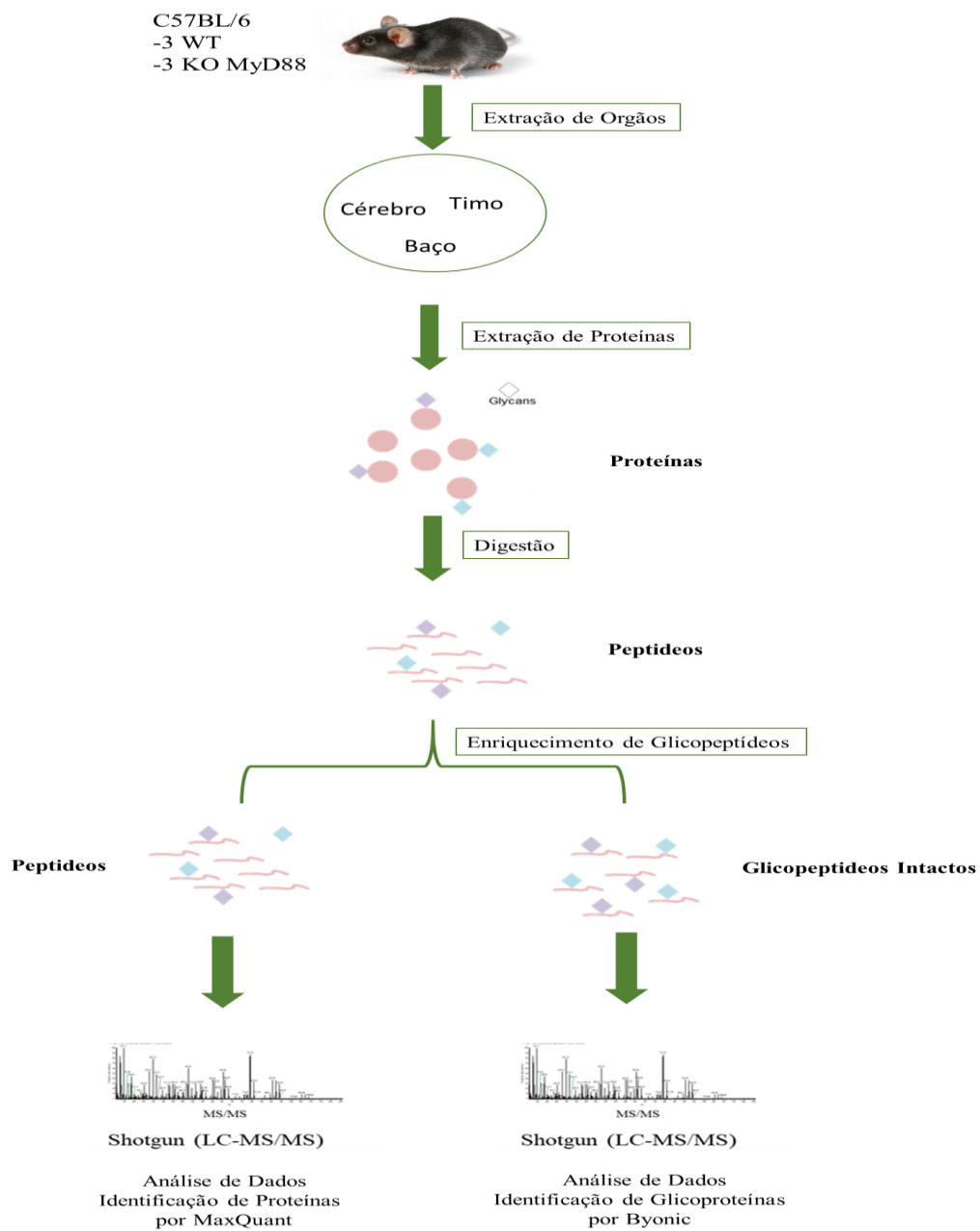
MaxQuant: carbamidometilação foi considerada uma modificação fixa enquanto a oxidação de metionina, deamidação de asparagina e acetilação no n-terminal foram consideradas modificações dinâmicas. Os seguintes parâmetros foram utilizados: Clivagem com tripsina e peptídeos com até duas falhas de clivagem; massa do íon precursor: tolerância de 10 ppm; e taxa de detecção falsa (FDR) menor que 0,01 no nível de proteína e peptídeos. Análise quantitativa livre de marcadores foi realizada. A quantificação relativa das proteínas foi calculada utilizando a intensidade do XIC (*extracted ion chromatogram*) dos peptídeos de cada proteína de acordo com o algoritmo *label free quantification* (MaxLFQ) (COX et al., 2014).

Byonic: Os glicopeptídeos intactos fragmentados por HCD stepped collision, para cada amostra foram comparados com um banco de dados usando o Byonic software v2.6.46 (Protein Metrics, <https://www.proteinmetrics.com/>). A busca foi realizada com as seguintes modificações fixas: massa do íon precursor: tolerância de 10ppm; tolerância da massa do íon de 0,02Da, carbamidometilação de Cys, clivagem por tripsina com no máximo dois valores faltantes por peptídeo e as seguintes modificações variáveis: oxidação da Met (+15.994 Da), e N-glicosilação localizada em Asn com um banco de dados pré-definidos de 309 glicanos de mamíferos. Todas as buscas foram filtradas com taxa de falsos positivos (FDR) <0,01 no nível de proteínas e peptídeos usando um banco de dados (decoy database) de sequências reversas. Como critério, somente glicopeptídeos identificados com alto *score* ID, serão considerados (PEP 2D < 0.001).

Scores PEP 2D menores que 0.001 significam que há menos de 0,1% de chance de ter uma anotação errônea do peptídeo (mas não uma anotação correta do sítio e a composição do glicano).

O conjunto de dados foi então analisado com o *software* Perseus 1.5.3.2. Utilizando essa plataforma, a análise de componentes principais (PCA) foi realizada como método de redução de dimensões, permitindo o estudo do comportamento das amostras de acordo com as proteínas quantificadas. As proteínas e glicopeptídeos regulados foram selecionadas de acordo com *Student's T-test* (FDR<0,05) e uma rede de interações proteína-proteína foi feita na página *String*: <https://string-db.org/>.

Figura 3 - Fluxograma de trabalho para análise do Proteoma e Glicoproteoma Intacto N-ligado.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise proteômica comparativa dos órgãos baço, cérebro e timo em camundongos deficientes para MYD88 e selvagens.

Os órgãos, baço, cérebro e timo foram isolados de 6 camundongos machos no total, 3 MYD88<sup>-/-</sup> e 3 selvagens. As proteínas desses órgãos foram então extraídas em PBS com inibidores de protease e analisadas por meio da abordagem proteômica “bottom-up ou shotgun” quantitativa, baseada em espectrometria de massa (LC-MS/MS), nas quais as proteínas são submetidas a digestão enzimática, neste caso a tripsina. Em seguida um cruzamento entre o banco de dados de *Mus musculus* retirado da página Uniprot e as sequências peptídicas identificadas por LC-MS/MS foi feita através do programa MaxQuant. Após identificação das proteínas uma análise estatística foi realizada como descrito na parte de materiais e métodos (**Figura 3**).

Escolheu-se estes órgãos, pois tanto baço como timo são órgãos que estão envolvidos diretamente com o sistema imune. No timo linfócitos T são diferenciados e são responsáveis por coordenar o sistema imunológico inato e adaptativo. Essas células podem ser do tipo efectoras ou auxiliares. O baço além de ser responsável pela remoção de células sanguíneas possui funções específicas de defesa como o armazenamento de macrófagos e plaquetas (IQWiG, 2010). O cérebro foi escolhido devido a interesses do laboratório em outros estudos.

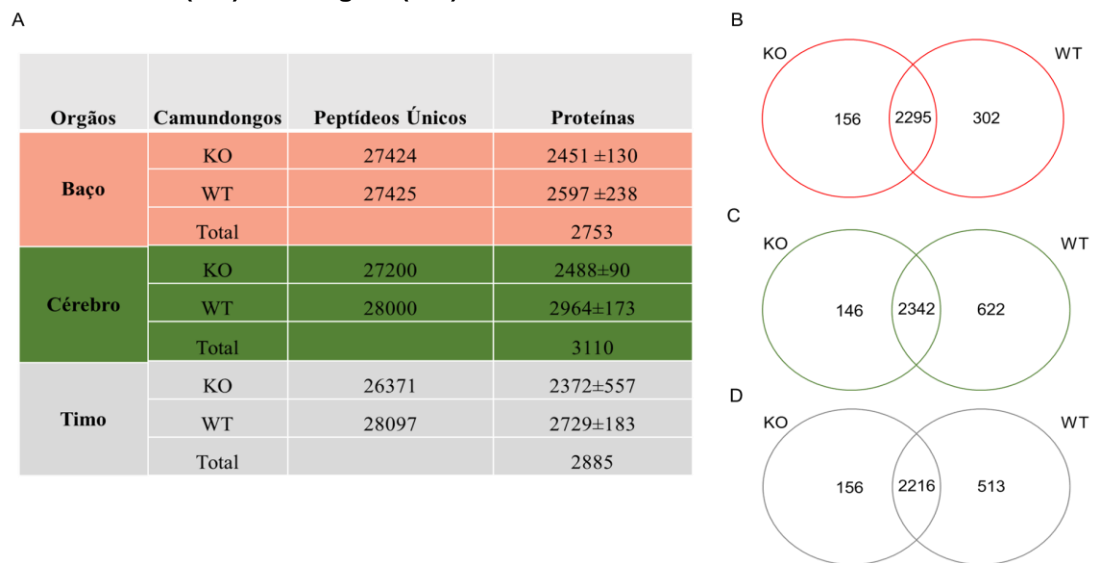
Esta análise comparou o proteoma dos órgãos MYD88<sup>-/-</sup> (KO, do inglês *knockout*) e selvagem (WT, do inglês *wild type*). Para o baço foram identificadas um total de 2753 proteínas únicas, sendo 2451 para KO e 2597 para WT. Para o cérebro foram identificadas um total de 3110 proteínas, sendo 2488 para KO e 2964 para WT. Para o timo foram identificadas um total de 2885 proteínas, sendo 2372 para KO e 2729 para WT (**Figura 4A**).

O algoritmo *label free quantification* (LFQ) foi utilizado para extrair a intensidade de cada peptídeo identificado e inferir a abundância relativa das proteínas nas três espécies. Estes valores de intensidade foram utilizados para comparar a abundância das proteínas nos dois grupos apresentados. Para o teste estatístico, selecionamos as

proteínas identificadas e quantificadas em no mínimo duas réplicas biológicas em pelo menos um dos grupos. Esse filtro foi incluído para selecionar proteínas reguladas através da análise estatística *Student's T-test* (FDR<0,05) de forma reprodutível.

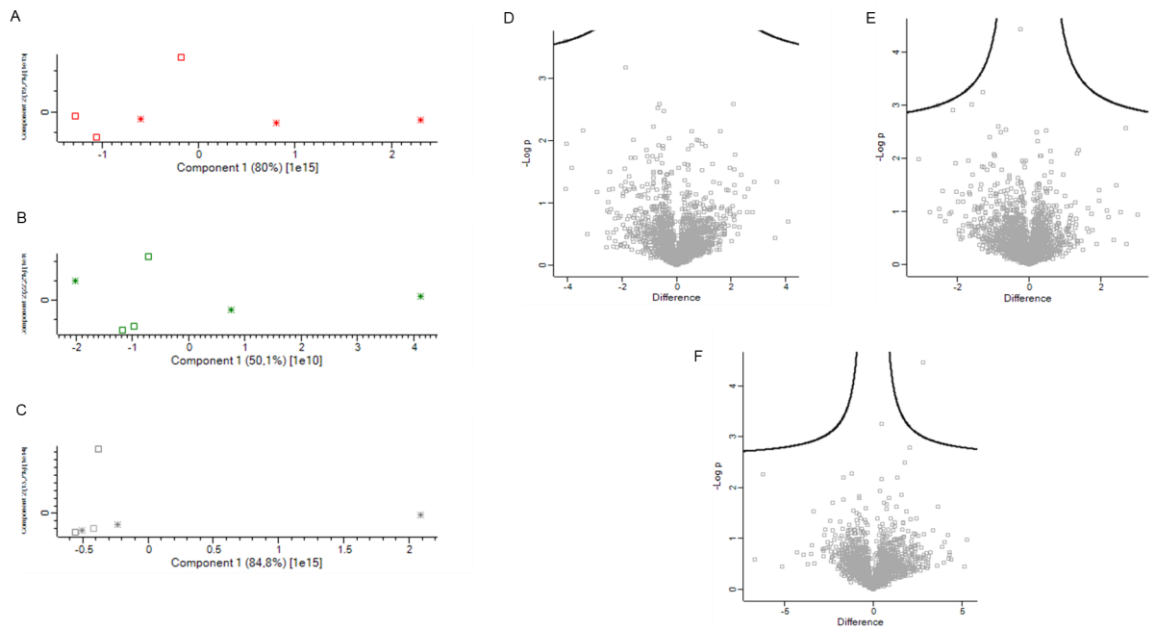
A análise realizada do perfil de proteínas totais nos grupos KO e WT nos 3 órgãos revelou que embora o número de proteínas compartilhadas seja elevado 83%, 75% e 77% para baço, cérebro e timo respectivamente (**Figura 4B, 4C e 4D**), não foram identificadas proteínas reguladas entre os grupos como mostra a análise estatística (**Figura 5D, 5E e 5F**). É possível notar que os dois grupos estão bem dispersos como mostra a análise de componentes principais, PCA (**Figura 5A, 5B e 5C**), o que pode ter influenciado o resultado estatístico. No entanto proteínas únicas, definidas como presentes em somente uma condição, foram identificadas em cada órgão constituindo para o baço 6,7% KO e 10% WT, para o cérebro 4,7% KO e 20% WT e timo 5,4% KO e 17,7% WT. Para obter uma maior compreensão sobre a diferença entre as duas condições e as proteínas que as diferenciam uma análise mais profunda será feita posteriormente.

**Figura 4: Quantidade de proteínas identificadas nos órgãos, baço, cérebro e timo nos dois grupos de estudos MYD88<sup>-/-</sup> (KO) e selvagem (WT).**



A) Número de peptídeos únicos e a média de proteínas seguido do desvio padrão das três réplicas biológicas. B) Diagrama de Venn mostrando a relação de proteínas entre os grupos KO e WT para cada órgão, baço (B), cérebro (C) e timo (D).

**Figura 5: Comparação do perfil proteômico dos grupos MYD88<sup>-/-</sup> (KO) e selvagem (WT).**



PCA realizado com proteínas totais, antes da aplicação de teste estatístico. A) baço, B) cérebro e C) timo. Os quadrados identificam o grupo WT e as estrelas o grupo KO. Comparação dois a dois de proteínas reguladas utilizando *Student's T-test* (FDR<0,05), após *imputation* entre os grupos: D) baço E) cérebro e F) timo.

É importante ressaltar que a proteína adaptadora MYD88 foi identificada em uma réplica biológica do baço e uma do timo ambas no grupo selvagem. A maior abundância foi encontrada no baço. Esse resultado pode ter sido obtido devido a sua baixa abundância no lisado celular total. A não identificação de proteínas reguladas no nível de expressão pode indicar um controle pós-traducional de suas funções. Uma observação importante é que nesse estudo todas as análises foram feitas em condições fisiológicas sem nenhum desafio biótico ou abiótico.

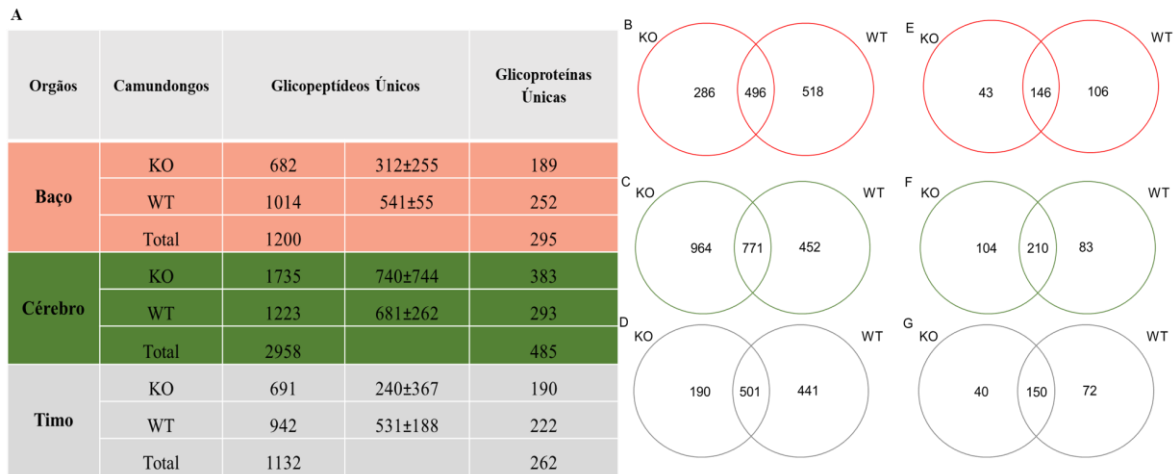
## 4.2 Análise glicoproteômica comparativa dos órgãos baço, cérebro e timo em camundongos *Knockout* para MYD88 e selvagens

A segunda análise comparou o glicoproteoma e os glicanos dos órgãos entre os camundongos MYD88<sup>-/-</sup> (KO) e selvagem (WT). Após digestão das proteínas por tripsina, uma alíquota foi retirada para enriquecimento de peptídeos glicosilados e posterior análise por espectrometria de massas. Em seguida um cruzamento entre o banco de dados de *Mus musculus* retirado da página Uniprot e as sequências glicopeptídicas identificadas por LC-MS/MS foi feita através do programa Byonic. Este programa permite a identificação da sequência peptídica do glicopeptídeo e seu provável sítio de glicosilação, mas não a composição exata do glicano. Após identificação dos glicopeptídeos uma análise estatística foi realizada.

No total foram identificados 3730 glicopeptídeos únicos e 751 glicoproteínas (**Figura 6**). A tabela 6A mostra a quantidade de glicopeptídeos identificados (esquerda) seguido pela média e desvio padrão de glicoproteínas (direita) de cada um dos grupos. Consideramos aqui a sequência peptídica dos glicopeptídeos somados aos glicanos a fim de eliminar duplicidades causadas por glicopeptídeos idênticos com diferentes glicoformas. Os diagramas de Venn mostram as quantidades de glicopeptídeos (**Figura 6B, 6C, 6D**) e glicoproteínas (**Figura 6E, 6F, 6G**) compartilhadas e exclusivas para cada grupo em cada órgão.

Para o baço foram identificados um total de 1200 glicopeptídeos, sendo 682 para KO e 1014 para WT. Para o cérebro foram identificados um total de 2958 glicopeptídeos, sendo 1735 para KO e 1223 para WT. Para o timo foram identificados um total de 1132 glicopeptídeos, sendo 691 para KO e 942 para WT (**Figura 6A**). Cerca de 49%, 43% e 57% das glicoproteínas foram encontradas compartilhadas entre KO e WT para baço, cérebro e timo respectivamente (**Figura 6E, 6F e 6G**).

**Figura 6: Quantidade de glicoproteínas identificadas nos órgãos, baço, cérebro e timo nos dois grupos de estudos MYD88<sup>-/-</sup> (KO) e selvagem (WT).**



A) Número de glicopeptídeos únicos seguido pela média e desvio padrão e glicoproteínas. Diagrama de Venn mostrando a relação de glicopeptídeos (esquerda) e glicoproteínas (direita) entre os grupos KO e WT para os órgãos baços (B, E), cérebro (C, F) e timo (D, G).

Chama a atenção o grande desvio na quantidade de glicopeptídeos únicos entre as réplicas de cada órgão, algumas delas chegando a ser maior que a própria média. A hipótese é a de que houve alguma falha no processamento e enriquecimento das glicoproteínas ou perdas durante a corrida no espectrômetro de massas.

É importante destacar também o número de glicoproteínas exclusivas em cada órgão para cada um dos grupos. Da mesma forma que as proteínas exclusivas serão estudadas posteriormente, também serão estudadas as glicoproteínas a fim de entender melhor quais famílias de glicoproteínas estão envolvidas da diferenciação dos dois grupos de estudo.

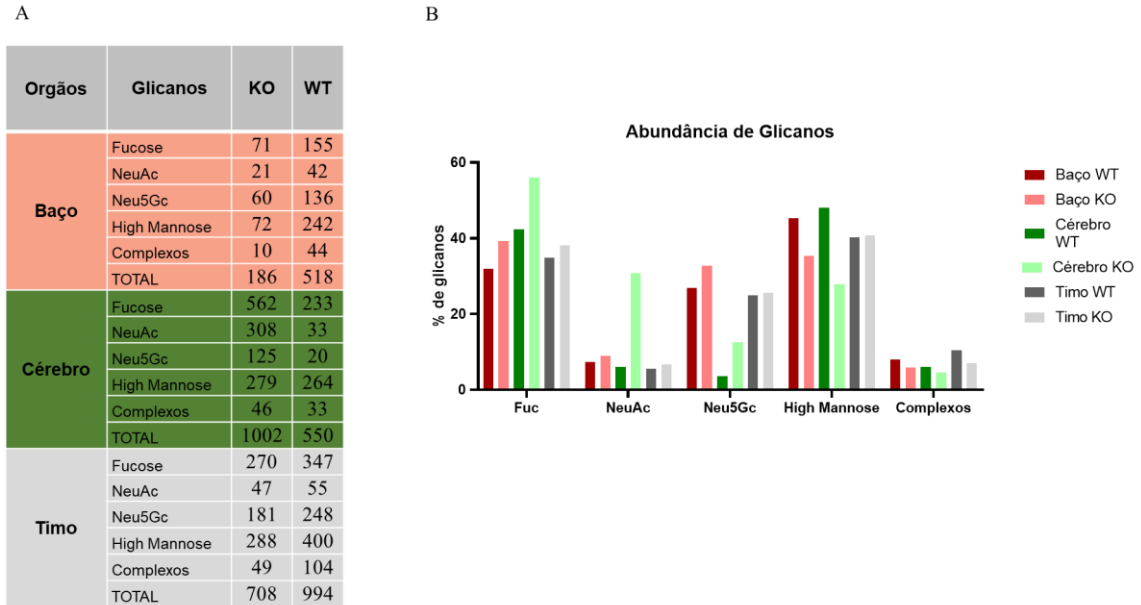
Associado ao MYD88 encontramos receptores Toll-like para o baço (TLR2, TLR7, TLR9 e TLR13) e para timo (TLR9), mas não para o cérebro. O estudo intitulado Exigência de maquinaria de glicosilação nas respostas TLR reveladas pela triagem CRISPR / Cas9, descreve a aplicação do sistema de triagem CRISPR / Cas9 usando linhagens celulares que expressam o repórter NF- $\kappa$ B GFP. O complexo oligossacarídeo transferase (OSTC) mediando a glicosilação co-traducional e Stt3a foram necessários para as respostas de TLR5, 7 e 9. Mais importante, a exclusão desses dois genes

influenciou a expressão de TLRs. A maturação dos TLRs requer a expressão e atividade da chaperona e proteína HSP90 associadas ao TLR4 A (PRAT4A) (CNPY3) (Sato et al., 2017).

Analisou-se também quais as classes de glicanos predominante em cada grupo e órgão. Essa análise foi necessária para desvendar características estruturais dos glicanos que mudavam no grupo MyD88<sup>-/-</sup>. A **Figura 7**, mostra os valores absolutos e em porcentagem de cada glicano nos órgãos para cada grupo, sendo a representação a soma das 3 réplicas. É possível notar nos 3 órgãos um aumento porcentual da quantidade de glicanos contendo fucose, ácido N-acetilneuramínico (um ácido siálico) e ácido N-glicolil-neuroamínico do grupo MyD88<sup>-/-</sup> em relação ao grupo selvagem. O cérebro foi o órgão que mais apresentou um aumento de glicanos do tipo ácido siálico variando de 6% a 31%. Uma parte das glicoproteínas encontradas sializadas possuem como função biológica o envolvimento na adesão celular, como integrinas e células neurais de adesão. A exceção a este aumento do grupo selvagem ao grupo MyD88<sup>-/-</sup> são as glicoproteínas que possuem glicosilação do tipo *high mannose* que apresentam comportamento inverso ou praticamente mesma abundância como no caso do timo.

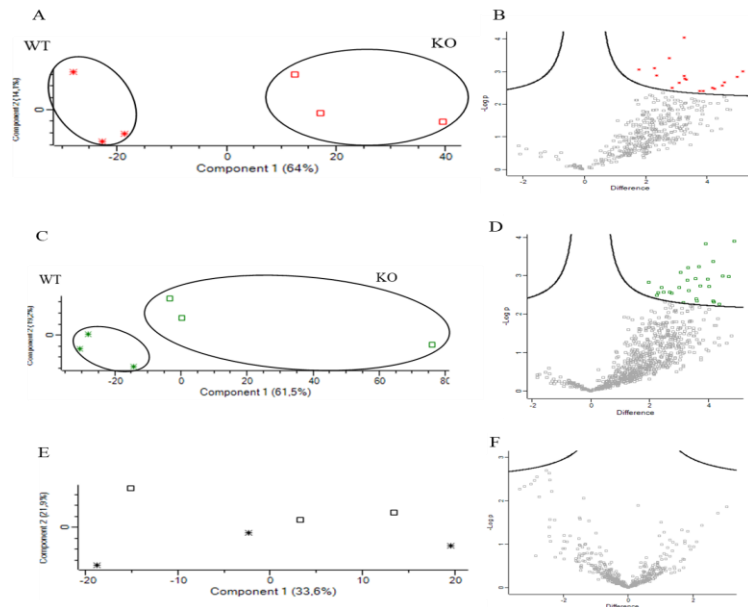
Uma análise multivariada do perfil de glicopeptídeos totais entre os grupos revela que o grupo MYD88<sup>-/-</sup> e o grupo selvagem não estão bem definidos entre si como mostra o PCA com destaque para o Timo impactando na análise estatística feita posteriormente (**Figura 8A, 8C e 8E**). Para o teste estatístico, *Student's T-test*, selecionamos os glicopeptídeos identificados e quantificados em no mínimo duas réplicas biológicas em pelo menos um dos grupos.

**Figura 7: Análise comparativa da abundância de glicanos em glicoproteínas nos grupos *knockout* para MYD88<sup>-/-</sup> (KO) e selvagem (WT) nos órgãos, baço, cérebro e timo.**



Os resultados apresentados consideram a presença ou não do glicano na sequência peptídica e representam a soma das 3 réplicas. Fuc: Fucose, NeuAc: Ácido N-acetilneuroamínico, Neu5Gc: Ácido N-glicolil-neuroamínico. Na tabela A os resultados estão em números totais enquanto no gráfico B os resultados estão em porcentagem.

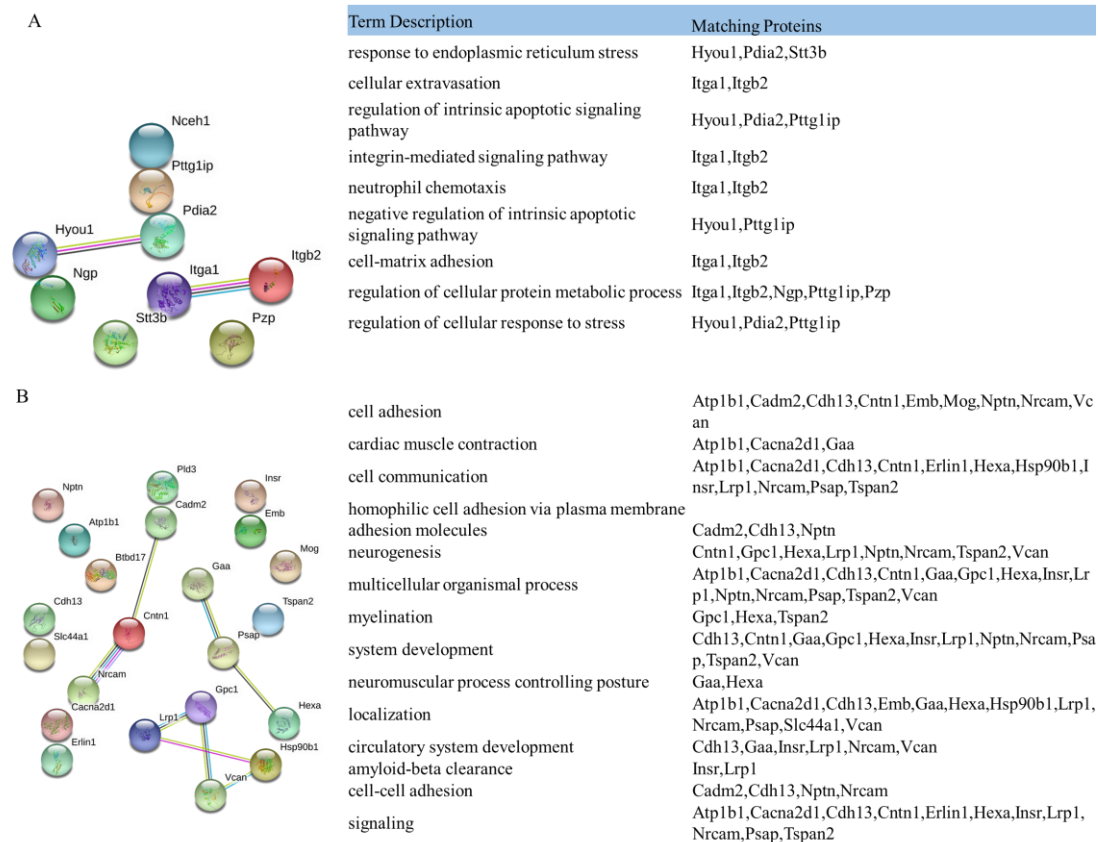
**Figura 8: Comparação do perfil glicoproteômico dos grupos MYD88<sup>-/-</sup> (KO) e selvagem (WT).**



PCA realizado com glicopeptídeos totais, antes da aplicação de *Student's T-test*: A) baço, C) cérebro e E) timo. As estrelas identificam o grupo WT e os quadrados o grupo KO. Comparação dois a dois de proteínas reguladas utilizando *Student's T-test* (FDR<0,05), após *imputation* entre os grupos: B) baço D) cérebro e F) timo.

Para o baço 385 glicopeptídeos foram identificados após filtrar dois valores válidos em pelo menos um dos grupos. Dezoito glicopeptídeos e 13 diferentes glicoproteínas foram identificados regulados positivamente para o grupo selvagem, após aplicação de *Student's T-test* (**Figura 8B**). Uma glicoproteína foi encontrada exclusiva para o grupo selvagem. Para o cérebro 771 glicopeptídeos foram identificados. 29 glicopeptídeos e 25 diferentes glicoproteínas foram identificados regulados positivamente para o grupo selvagem (**Figura 8D**). Nove glicoproteínas foram encontradas exclusivas para o grupo selvagem. Para o timo 497 glicopeptídeos foram identificados. Nenhuma glicoproteína foi encontrada regulada (**Figura 8F**). A **Figura 9** mostra uma rede de interação proteína-proteína realizada na página *String* com as glicoproteínas identificadas reguladas e os processos biológicos nos quais estão envolvidas.

**Figura 9. Rede de interação proteína-proteína das glicoproteínas reguladas**



A) Baço B) Cérebro.

Para o baço identificamos glicoproteínas de neutrófilos, IgM, integrinas e a glicoproteína Dolichol oligossacarídeo transferase envolvida na via de glicosilação de N-glicanos. Para o cérebro família de imunoglobulina e células de adesão. Algumas moléculas identificadas são bem específicas para este órgão como neuroplastina e células neurais de adesão. Uma tabela com os IDs de identificação dessas glicoproteínas, suas sequências glicopeptídicas e seus glicanos podem ser vistos na tabela 1 deste estudo.

Por fim observou-se que dentro de um mesmo grupo baço e timo possuem mais glicoproteínas compartilhadas entre si em relação ao cérebro o que concorda com o fato desses órgãos serem participativos na resposta imune do indivíduo apresentando moléculas em comum (**Figura 10**).

**Figura 10: Comparação de glicoproteínas entre os órgãos dentro do mesmo grupo**

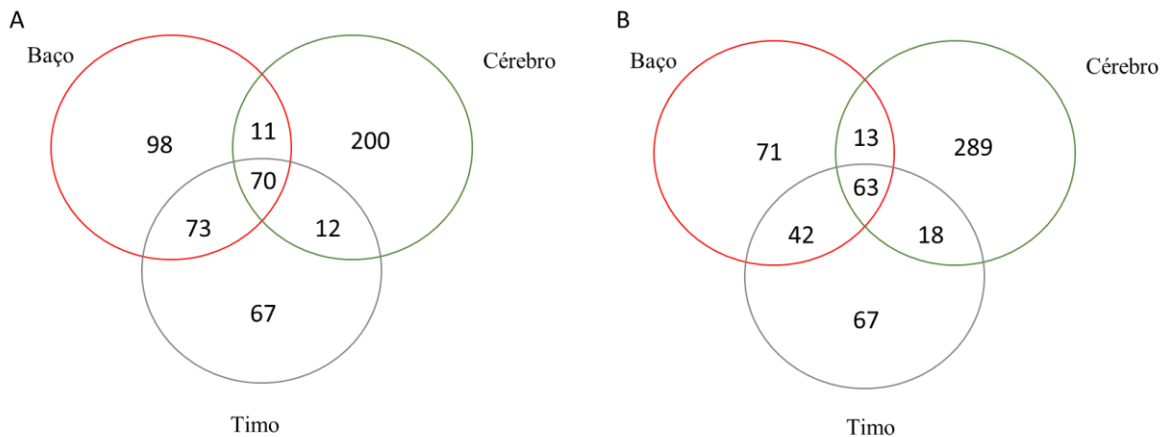


Diagrama de Venn mostrando a relação de glicoproteínas entre os órgãos baço, cérebro e timo. A: Grupo Selvagem. B: Grupo MYD88<sup>-/-</sup>.

Tabela 1 - Glicoproteínas reguladas no Baço e Timo.

Baço		
Difference	T: ProteinName	Sequencia e Glicanos
4,490232468	>sp D3Z6P0  Protein disulfide-isomerase A2	K.EEPKEPAASAPEAQAN[+1216.42286]STLGPKE.E_HexNAc(2)Hex(5)
4,572231929	>sp D3Z6P0  Protein disulfide-isomerase A2	K.EEPKEPAASAPEAQAN[+1378.47569]STLGPKEE.L_HexNAc(2)Hex(6)
3,884257634	>sp O08692  Neutrophilic granule protein	K.DC[+57.02146]DFLEDGEERN[+1784.63443]C[+57.02146]TGK.F_HexNAc(4)Hex(6)
5,170830409	>sp O08692  Neutrophilic granule protein	K.DC[+57.02146]DFLEDGEERN[+2059.73493]C[+57.02146]TGK.F_HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(1)
3,099517186	>sp P01872  Ig mu chain C region	K.IMESHPN[+1913.67702]GTFSAK.G_HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1)NeuGc(1)
3,250483831	>sp P01872  Ig mu chain C region	K.STGKPTLYN[+1378.47569]VSLIMSDTGGTC[+57.02146].Y_HexNAc(2)Hex(6)
3,313935598	>sp P11835  Integrin beta-2	K.FDKGPFEKN[+1864.63416]C[+57.02146]SVQC[+57.02146]AGMTLQTIPLK.K_HexNAc(2)Hex(9)
3,759602865	>sp Q3TDQ1  Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B	R.TTLVDN[+1702.58133]NTWNNNSHALVKG.A_HexNAc(2)Hex(8)
4,247676849	>sp Q3V3R4  Integrin alpha-1	K.ANQIVIPHNN[+1622.58161]TTFQTEPTK.M_HexNAc(4)Hex(5)
4,975378672	>sp Q61838  Pregnancy zone protein	R.IN[+2236.76227]VSYTGERPSSNMVIVDK.M_HexNAc(4)Hex(5)NeuGc(2)
3,246523539	>sp Q8BLF1  Neutral cholesterol ester hydrolase	K.GNYDFVEAMIVNN[+1702.58133]HTSLDVER.A_HexNAc(2)Hex(8)
1,789035161	>sp Q8R143  Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein	R.N[+1378.47569]VSC[+57.02146]LWC[+57.02146]NENK.A_HexNAc(2)Hex(6)
2,289928436	>sp Q9JKR6  Hypoxia up-regulated protein 1	R.AEPPLN[+1216.42286]ASAGDQEEK.V_HexNAc(2)Hex(5)
2,866845449	>tr A0A0R4J011  Serine protease inhibitor A3K	K.NLINDYVSN[+2382.82018]QTQGMK.K_HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)NeuGc(2)
3,265970866	>tr Q14DR9  ERO1-like beta (S. cerevisiae)	K.YSQAAN[+1216.42286]STKELDDC[+57.02146]EQANK.L_HexNAc(2)Hex(5)
2,771246592	>tr Q8CGB2  Thrombospondin 1	K.KVSC[+57.02146]PIMPC[+57.02146]SN[+1216.42286]ATVPDGC[+57.02146]C[+57.02146]PR.C_HexNAc(2)Hex(5)
4,164812088	>tr Q8CGB2  Thrombospondin 1	K.VSC[+57.02146]PIMPC[+57.02146]SN[+1784.63443]ATVPDGC[+57.02146]C[+57.02146]PR.C_HexNAc(4)Hex(6)
2,357472738	>tr Q8CGB2  Thrombospondin 1	K.VSC[+57.02146]PIMPC[+57.02146]SN[+1913.67702]ATVPDGC[+57.02146]C[+57.02146]PR.C_HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1)NeuGc(1)
Cérebro		
Difference	T: ProteinName	Sequencia e Glicanos
4,143935521	>sp O08532  Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1	K.VLKDAVNN[+1540.52851]ITAK.G_HexNAc(2)Hex(7)
3,318522771	>sp O35405  Phospholipase D3	R.YNQETPMEIC[+57.02146]LN[+1378.47569]GTPALAYLASAPPLC[+57.02146]PSGR.T_HexNAc(2)Hex(6)
4,674328486	>sp P08113  Endoplasmic	R.TDDEVVQREEEAIQLDGLN[+1378.47569]ASQIR.E_HexNAc(2)Hex(6)
2,478685379	>sp P12960  Contactin-1	R.GKAN[+1444.53387]STGLTVITNPT.R_HexNAc(4)Hex(3)Fuc(1)
3,273044586	>sp P12960  Contactin-1	R.GKAN[+1419.50224]STGLTVITNPT.R_HexNAc(3)Hex(5)
4,856789907	>sp P14094  Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	K.LDWLGN[+2158.80335]C[+57.02146]SGLNDDSYGYR.E_HexNAc(6)Hex(4)Fuc(2)
1,970436732	>sp P15208  E Insulin receptor	K.EC[+57.02146]LGN[+1378.47569]C[+57.02146]SEPDDPTK.C_HexNAc(2)Hex(6)
2,746842702	>sp P21995  Embigin	K.SC[+57.02146]N[+1216.42286]ISVTEK.S_HexNAc(2)Hex(5)
3,551538467	>sp P21995  Embigin	K.SC[+57.02146]N[+1378.47569]ISVTEK.S_HexNAc(2)Hex(6)
3,611321131	>sp P29416  E Beta-hexosaminidase subunit alpha	K.SAEGTFFIN[+1540.52851]K.T_HexNAc(2)Hex(7)
2,685763041	>sp P70699  Lysosomal alpha-glucosidase	R.GVFITN[+1540.52851]ETGQPLIGK.V_HexNAc(2)Hex(7)
2,99432373	>sp P97300  Neuroplastin	K.AN[+1378.47569]ATIEVK.A_HexNAc(2)Hex(6)
3,893680573	>sp Q61885  Myelin-oligodendrocyte glycoprotein	R.ISPGKN[+1444.53387]ATGMEVGWYR.S_HexNAc(4)Hex(3)Fuc(1)
3,309244792	>sp Q62059  Versican core protein	R.FEN[+1752.64460]QTC[+57.02146]FPLPDSR.F_HexNAc(4)Hex(4)Fuc(2)
3,668053309	>sp Q6X893  Choline transporter-like protein 1	K.FAein[+1540.52851]GSALC[+57.02146]SYNIKPSEYTLTK.S_HexNAc(2)Hex(7)
2,232568105	>sp Q810U4  Neuronal cell adhesion molecule	K.EDGMPLPAN[+1752.64460]R.T_HexNAc(4)Hex(4)Fuc(2)
4,008979797	>sp Q91X78  Erlin-1	R.N[+1378.47569]YTADYDK.T_HexNAc(2)Hex(6)
4,175474803	>sp Q91ZX7  Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	R.FGTC[+57.02146]SQLC[+57.02146]N[+1216.42286]NTK.G_HexNAc(2)Hex(5)
3,053654353	>sp Q922I6  Tetraspanin-2	R.GN[+1565.56014]GTLTIFHSAFQC[+57.02146]C[+57.02146]GK.E_HexNAc(3)Hex(5)Fuc(1)
4,156509399	>sp Q9DB72  BTB/POZ domain-containing protein 17	K.FFHVN[+1864.63416]GSAFLPR.N_HexNAc(2)Hex(9)
3,582579931	>sp Q9QZF2  Glypican-1	R.IC[+57.02146]PQGYTC[+57.02146]C[+57.02146]TSEMEENLAN[+1647.61324]HSR.M_HexNAc(5)Hex(3)Fuc(1)
3,723122279	>sp Q9WTR5  Cadherin-13	K.IN[+1727.61297]NTHALVSLQLNLN.K_HexNAc(3)Hex(6)Fuc(1)
3,969122569	>tr A0A0R4J117  Immunoglobulin superfamily member 8	R.IGPGEPELLLC[+57.02146]N[+1930.69234]VSGALPPPGR.H_HexNAc(4)Hex(6)Fuc(1)
2,405813217	>tr A0A286YDA3  BDNF/NT-3 growth factors receptor	K.HMN[+1768.63952]ETSHTQGSRL.I_HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)
2,281609853	>tr A0A286YDA3  BDNF/NT-3 growth factors receptor	R.ITN[+1647.61324]ISSDDSGK.Q_HexNAc(5)Hex(3)Fuc(1)
4,369366964	>tr G3UZM4  Cell adhesion molecule 2 (Fragment)	R.VDHESLN[+1955.72397]ATPQVAMQVLEIHYTPSVK.I_HexNAc(5)Hex(4)Fuc(2)
4,472263336	>tr Q6ZQ96  MKIAA0550 protein (Fragment)	R.TPAGDLAFNQC[+57.02146]PLN[+1647.61324]ATGTTSR.R_HexNAc(5)Hex(3)Fuc(1)
3,149835587	>tr Q8BFQ1  Prosaposin	K.DN[+1540.52851]ATQEEILHYLEK.T_HexNAc(2)Hex(7)

## 5. DISCUSSÃO

A proteína adaptadora MYD88 conhecida por intermediar cascatas de sinalização relacionada a resposta imune inata, pela primeira vez foi alvo de um estudo que lhe atribuiu um novo papel. Os resultados obtidos inferem que a adaptador MYD88 possui uma influência na tradução de proteínas a nível pós-traducional. A modificação pós-traducional com glicanos como vimos anteriormente está envolvida com o processo adaptativo e resposta imune inata exercendo modificações temporárias e fixas em células. Essas modificações podem ser peças-chave na identificação de diversos distúrbios. Um exemplo identificado em nosso estudo foi a diferença de expressão e de glicosilação da glicoproteína Dolichol-difosfoligossacarídeo glicosiltransferase subunidade STT3B encontrada regulada no baço grupo selvagem.

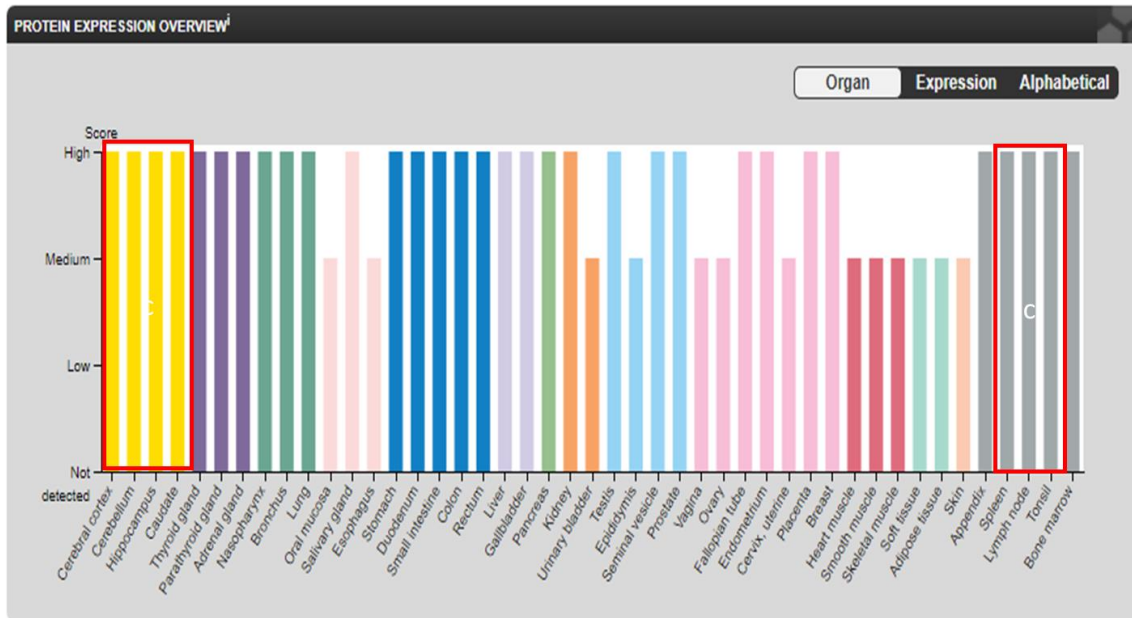
A **figura 11A** mostra o espectro do peptídeo R.TTLVDNNTWNNSHIALVGK.A pertencente a esta proteína encontrada no baço selvagem. A **figura 11** mostra 3 sequências de peptídeos pertencentes a esta mesma proteína com suas respectivas glicofomas. Os dois primeiros possuem o mesmo sítio de glicosilação com dois glicanos distintos: HexNAc(2)Hex(10), glicano do tipo complexo e HexNAc(2)Hex(9), glicano do tipo high mannose. O terceiro possui um diferente sítio de glicosilação com um outro glicano HexNAc(2)Hex(8) do tipo high mannose.

A página *Atlas Protein Human* traz a expressão da proteína e de RNA do MyD88 em diversos órgãos (**Figura 12**). Nota-se que no nível da proteína não há diferenças significativas entre os órgãos cérebro, baço e timo (**Figura 12A**). Já no nível do RNA temos uma maior expressão do adaptador MYD88 nos órgãos associados ao sistema imune, baço e timo em comparação com cérebro (**Figura 12**). Em nosso estudo obtivemos valores de glicopeptídeos regulados no baço e cérebro bem próximos, 3,6% e 3,3% respectivamente e nenhum resultado para o timo. Acreditamos que esses resultados quanto os grandes desvios encontrados entre as réplicas tenham sido influenciados pela grande variabilidade biológica encontrada entre as réplicas como já mencionado anteriormente.

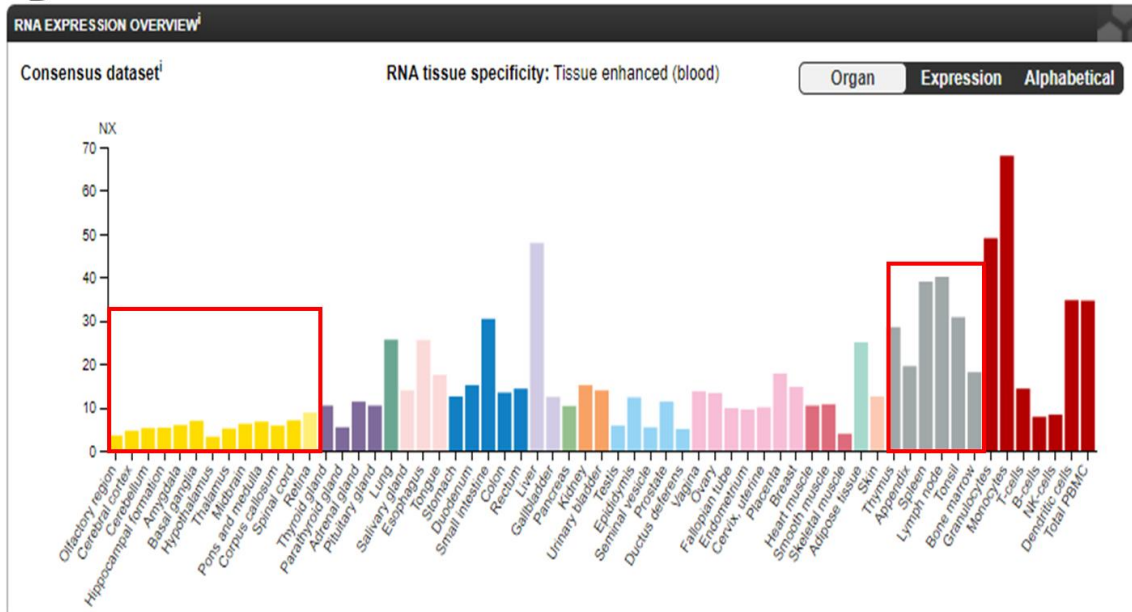


Figura 12: Expressão da proteína MyD88 e RNA em diversos tecidos.

A



B



Fonte: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000172936-MYD88/tissue>.

As caixas vermelhas referem-se ao cérebro e órgãos associados ao sistema imune como timo e baço.

Discutiremos agora algumas modificações muito estudadas e que estão envolvidas diretamente em distúrbios imunológicos e que tiveram um aumento em sua expressão no grupo MyD88<sup>-/-</sup> em relação ao grupo selvagem.

## 5.1 Glicanos complexos

A ramificação e modificação de N-glicanos são etapas muito importantes para a produção de oligossacarídeos maduros no complexo de Golgi. As N-acetilglucosaminiltransferases (GnTs) presentes no lúmen do Golgi e designadas como GnT-I-VI, estão envolvidas na biossíntese de glicanos complexos. Diferentes tipos de glicanos podem ser adicionadas às suas extremidades não redutoras, como galactoses, fucoses e ácido siálico (GUPTA et al., 2007).

## 5.2 Fucosilação

A fucosilação de proteínas está envolvida em uma variedade de processos biológicos como adesão celular, desenvolvimento de tecidos, angiogênese e metastase tumoral (MA; SIMALA-GRANT; TAYLOR, 2006; MIYOSHI; MORIWAKI; NAKAGAWA, 2008).

Esse processo é catalisado por 13 genes de fucosiltransferase (FUTs) que transferem o resíduo fucose do GDP-fucose para o resíduo N-acetilglucosamina (GlcNac) ligado a asparagina (Asn). Uma das mais estudadas é a FUT8 por meio de uma ligação  $\alpha$ -1,6 no complexo de Golgi (LIANG et al., 2018). O FUT8 é amplamente expresso em tecidos de mamíferos e a fucosilação do núcleo (Man3GlcNAc2-PP-Dol) tem demonstrado ter um impacto significativo no crescimento e diferenciação celular (XIANG; CHAO; FENG, 2015). Além disso a fucosilação terminal desempenha papel vital na formação de ligantes de selectina, envolvidas na seleção de moléculas de adesão celular na superfície das células endoteliais sendo responsável pelo controle e localização de linfócitos dependentes de selectina, o recrutamento de leucócitos e a migração de células tumorais (HOMEISTER et al., 2001; ZIPIN et al., 2004).

Outros exemplos de importantes células que contém fucose em sua estrutura são: antígenos do sistema ABO (BECKER; LOWE, 2003; ZHANG; WANG, 2016), complexo de receptores de células T (TCR) e receptores de células T CD4<sup>+</sup> (LIANG et al., 2018).

Muitos estudos já foram realizados para entender qual o papel da fucosilação em diversas doenças. Alterações na fucosilação tem sido associadas a diversos quadros inflamatórios como artrite reumatoide (LI et al., 2014), pancreatite crônica (SARRATS et al., 2010), doença de Chohn (MIYOSHI et al., 2011) e Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (LIANG et al., 2018).

Liang et al. (2018) confirmou que pacientes com Lúpus Eritematoso sistêmico (LES) exibem uma hiperfucosilação de células T CD4<sup>+</sup>, e que um *knockout* na fucosiltransferase 8 (FUT8) resultou em uma diminuição da interação entre células B e T via TCR-pMHCII levando a uma redução da ativação de células T CD4<sup>+</sup>. A fucosilação de TCR poderia então regular o reconhecimento do pMHCII (moléculas do complexo de histocompatibilidade II) e afetar a ativação de células T. Dessa forma a hiperfucosilação do TCR poderia servir como um biomarcador de pacientes com LES. Além disso a fucosilação também estaria envolvida na troca de classes de imunoglobulinas, pois células T CD4<sup>+</sup> secretam citocinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IFN- $\gamma$  que contribuem para a troca de classe de IgG (LIANG et al., 2018).

Outra célula também relacionada a células T é a proteína PD-1, proteína de morte celular programada. Essa proteína envia sinais inibitórios para a ativação de T e necessita da fucosilação para que seu ligante possa ligar-se a superfície celular. Quando há inibição da fucosilação, há uma desregulação da atividade de PD-1, com ativação de células T e consequente supressão do tumor (OKADA et al., 2017). O Estudo realizado Higai et al. (2006) por mostrou que células K562 de leucemia quando transfectadas com FUT3 aumentaram a expressão de antígenos sialil Lewis x em sua superfície celular. Este aumento de antígenos fez com que essas células se tornassem 2,5 vezes mais suscetíveis a toxicidade de células KHYG derivadas de NK (natural killer), aumentando assim a resposta inflamatória contra essas células (HIGAI; ICHIKAWA; MATSUMOTO, 2006).

### 5.3 Sialilação

Enquanto a fucosilação está envolvida no recrutamento de células do sistema imune inato e aumento na ativação de células T contribuindo para uma maior atividade inflamatória a sialilação age em sentido oposto como um anti-inflamatório (BÖHM et al., 2012; KANEKO; NIMMERJAHN; RAVETCH, 2006).

Anticorpos são altamente glicosilados e a perda de glicosilação ou glicosilação aberrante provoca a perda da capacidade de ativar o complemento, de se ligar a receptores Fc e de induzir citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Vimos que a N-acetilglucosamina (GlcNAc) é a principal estrutura do N-glicano e essa estrutura é essencial para a meia-vida dos anticorpos monoclonais no plasma. A GlcNAc é capaz de ligar-se à receptores de manose e depois de removidos, reduzem a meia-vida da glicoproteína na circulação sanguínea (JONES et al., 2007; STAHL, 1992; ZHANG et al., 2019).

Anticorpos monoclonais (MAbs) possuem muitas N-glicofomas. Em alguns casos sua N-glicofoma não interfere na farmacocinética ou meia vida dos anticorpos, mas sabe-se que a sua sialilação induz a expressão de receptores inibitórios Fcγ RIIb fazendo com que a IgG tenha atividade anti-inflamatória através da inibição de seu sistema complemento (HAYES et al., 2014). Ainda sobre IgG o estudo realizado por Oefner et al. (2012) verificou que em condições inflamatórias induzidas por LPS, as células plasmáticas expressam baixos níveis de  $\alpha 2,6$ -sialiltransferase e produzem IgG desialilada. No entanto após imunização ou condições tolerogênicas, as células expressam um aumento no nível de  $\alpha 2,6$ -sialiltransferase produzindo um IgG sialilado com funções imunossupressoras bloqueando resposta de células T e B específicas de antígeno, maturação de células dendríticas e inflamação alérgica das vias aéreas (OEFNER et al., 2012).

Outro estudo indicou que o estado de sialilação determina a capacidade da IgM de ser internalizada pelas células T e de inibir sua ativação. O mais interessante é que outros tipos de glicoproteínas, não anticorpos, ricas em ácido siálico não inibem a proliferação de células T, sendo específico para IgM (COLUCCI et al., 2015) de forma que a imunoglobulina sialilada pode ser utilizada no tratamento de diversas doenças

autoimune e doenças inflamatória (GOULABCHAND et al., 2014; HESS et al., 2013; SCHWAB; NIMMERJAHN, 2013). Por fim o estudo realizado com a proteína G do vírus da estomatite vesicular mostrou que esta proteína utiliza o ácido siálico através de uma ligação  $\alpha$ -2-3 para inibir a resposta inflamatória através da inibição da ação de NF- $\kappa$ B e MAPK. Quando tratado com PNGase F, enzima que cliva glicano de proteínas na porção GlcNAc e Asparagina não houve inibição de fosforilação de NF- $\kappa$ B, modificação necessária para ativar o fator de transcrição (LI et al., 2020).

## 6.CONCLUSÃO

Diferenças na expressão de proteínas entre o grupo selvagem e *knockout* para MYD88 não foram encontradas, no entanto ao analisarmos glicoproteínas, moléculas importantes para o sistema imunológico foram identificadas. Partindo de uma análise qualitativa foi possível perceber um aumento no número de glicanos contendo fucose, ácido siálico, ácido N-glicolil-neuroamínico e complexos em camundongo *knouckout* e diminuição de glicanos do tipo *high mannose* quando comparados a camundongos selvagens o que leva a crer que o adaptador MYD88 possui funções importantes de regulação envolvidos com a síntese de glicoproteínas na resposta inflamatória, mesmo em situações não patológicas. Embora o número de glicoproteínas identificadas reguladas estatisticamente tenha sido baixo 13 para baço, 25 para o cérebro e 0 para timo os resultados apontam para a dificuldade na obtenção de réplicas mais homogêneas. Dessa forma uma melhora na técnica do processamento de proteínas poderia ser a chave para melhores resultados. Este foi um estudo precursor abrindo portas para mais investigações e utilização de outras técnicas como PCR e glicômica para melhor entender a interação entre o adaptador MyD88, transcrição, tradução e modificações pós-traducionais.

## 7.REFERENCIAS

- ADACHI, O; KAWAI, T; TAKEDA, K; MATSUMOTO, M; TSUTSUI, H; SAKAGAMI, M; NAKANISHI, K; AKIRA, S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL18-mediated function. **Immunity**, v. 9, n. 1, p. 143-50, Jul 1998. ISSN 1074-7613
- AEBI, M; BERNASCONI, R; CLERC, S; MOLINARI, M. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. **Trends Biochem Sci**, v. 35, n. 2, p. 74-82, Feb 2010. ISSN 0968-0004
- BARBOZA, R; REIS, A. S; DA SILVA, L. G; HASENKAMP, L; PEREIRA, K. R B; CÂMARA, N. O. S; MARANHÃO, F. T; LIMA, M. R. D; ALVAREZ, J. M; BOSCARDINI, S. B; EPIPHANIO, S; MARINHO, C. R. F. MyD88 signaling is directly involved in the development of murine placental malaria. **Infection and immunity**, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 830–838, 2014. DOI: 10.1128/IAI.01288-13.
- BARBOZA, R; HASENKAMP, L; BARATEIRO, A; MURILLO, O; PEIXOTO, E. P. M; LIMA, F. A; REIS, A. S; GONÇALVES, L. A; EPIPHANIO, S; MARINHO, C. R. F. Fetal-Derived MyD88 Signaling Contributes to Poor Pregnancy Outcomes During Gestational Malaria. **Frontiers in microbiology**, [S. l.], v. 10, p. 68, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00068.
- BECKER, D. J.; LOWE, J. B. Leukocyte adhesion deficiency type II. **Biochim Biophys Acta**, v. 1455, n. 2-3, p. 193-204, Oct 8 1999. ISSN 0006-3002
- BECKER, D. J.; LOWE, J. B. **Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals****Glycobiology**, 2003. DOI: 10.1093/glycob/cwg054.
- BEUTLER, B. HOEBE, K; GEORGE, P; TABETA, K; XIN, D. Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins. **Adv Exp Med Biol**, v. 560, p. 29-39, 2005. ISSN 0065-2598
- BÖHM, S; SCHWAB, I; LUX, A; NIMMERJAHN, F. The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG. **Seminars in Immunopathology**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 443–453, 2012. DOI: 10.1007/s00281-012-0308-x.
- BURNS, K. JANSSENS, S; BRISSONI, B; OLIVOS, N; BEYARTE, R; TSHOPP, J. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. **J Exp Med**, v. 197, n. 2, p. 263-8, Jan 20 2003. ISSN 0022-1007
- BURNS, K. MARTINON, F; ESSLINGER, C; PAHL, H; SCHNEIDER, P; BODMER, J. L; DI MARCO, F; FRECH, L; TSHOPP, J. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. **J Biol Chem**, v. 273, n. 20, p. 12203-9, May 15 1998. ISSN 0021-9258
- CHEN, G.; GOEDDEL, D. V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1634-5, May 31 2002. ISSN 1095-9203

CHUANG, T.; ULEVITCH, R. J. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1518, n. 1-2, p. 157-61, Mar 19 2001. ISSN 0006-3002

COLUCCI, M; STÖCKMAN, H; BUTERA, A; MASOTTI, A; GIORDA, E; PETRINI, S; RUDD, P. M ; SITIA, R; EMMA, F; VIVARELLI, M. Sialylation of N-Linked Glycans Influences the Immunomodulatory Effects of IgM on T Cells. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 194, n. 1, p. 151–157, 2015. DOI: 10.4049/jimmunol.1402025.

COX, J; HEIN, M. Y; LUBER, C. A; PARON, I; NAGARAJ, N; MANN, M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 9, p. 2513-26, Sep 2014. ISSN 1535-9484

DEGUINE, J.; BARTON, G. M. MyD88: a central player in innate immune signaling. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 97, 2014. ISSN 2051-7599

DU, X; POLTORAK, A; WEI, Y; BEUTLER, B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. **Eur Cytokine Netw**, v. 11, n. 3, p. 362-71, Sep 2000. ISSN 1148-5493

FREEZE, H. H.; WESTPHAL, V. Balancing N-linked glycosylation to avoid disease. **Biochimie**, v. 83, n. 8, p. 791-9, Aug 2001. ISSN 0300-9084

GERKEN, T. A; JAMISON, O; PERRINE, C. L; COLETTE, J. C; MOINOVA, H; RAVI, L; MARKOWITZ, S. D; SHEN, W; PATEL, H; TABAK, L. A. Emerging paradigms for the initiation of mucin-type protein O-glycosylation by the polypeptide GalNAc transferase family of glycosyltransferases. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 286, n. 16, p. 14493–14507, 2011. DOI: 10.1074/jbc.M111.218701.

GOULABCHAND, R.; VINCENT, T.; BATTEUX, F; ELIAOU, J; GUILPAIN, P. **Impact of autoantibody glycosylation in autoimmune diseases** *Autoimmunity Reviews* Elsevier, , 2014. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.02.005.

GUO, H; ABBOTT, K. L. Functional impact of tumor-specific N-linked glycan changes in breast and ovarian cancers. **Advances in cancer research**, [S. l.], v. 126, p. 281—303, 2015. DOI: 10.1016/bs.acr.2014.11.006.

GUPTA, S. K; SISODIA, B. S; SINHA, S; HAJELA, K; NAIK, S; SHASANY, A. K; DUBE, A. Proteomic approach for identification and characterization of novel immunostimulatory proteins from soluble antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. **Proteomics**, [S. l.], 2007. DOI: 10.1002/pmic.200600725.

HAYES, J. M.; COSGRAVE, E. F. J.; STRUWE, W. B.; WORMALD, M.; DAVEY, G. P.; JEFFERIS, R; RUDD, P. M. **Glycosylation and Fc receptors** *Current Topics in Microbiology and Immunology* Springer Verlag, , 2014. DOI: 10.1007/978-3-319-07911-0\_8.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes Dev**, v. 18, n. 18, p. 2195-224, Sep 15 2004. ISSN 0890-9369

HESS, C; WINKLER, A; LORENZ, A. K; HOLECSKA, V; BLACHARD, V; EIGLMEIER, S; SCHOEN, A; BITTERLING, J; STOEHR, A. D; PETZOLD, D; SCHOMMARTZ, T; MERTES, M. M. M; SCHOEN, C. T; TIBURZY, B; HERRMANN, A; KÖHL J; MANZ, R. A; MADAIO, M. P; BERGER, M; WARDEMANN, H; EHLERS. M. T cell-independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 123, n. 9, p. 3788–3796, 2013. DOI: 10.1172/JCI65938.

HIGAI, K; ICHIKAWA, A; MATSUMOTO, K. Binding of sialyl Lewis X antigen to lectin-like receptors on NK cells induces cytotoxicity and tyrosine phosphorylation of a 17-kDa protein. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1760, n. 9, p. 1355–1363, 2006. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.03.015.

HOMEISTER, J. W. THALL, A. D; PETRYNIAK, B; MALÝ, P; SMITH, P. L; KELLY, R. J; GERSTEN, K. M; ASKARI, S. W; CHENG, G; SMITHSON, G; MARKS, R. M; MISRA, A. K; HINDSGAUL, O; von ADRIAN, U. H; LOWE, J. B. The  $\alpha(1,3)$ fucosyltransferases FucT-IV and FucT-VII exert collaborative control over selectin-dependent leukocyte recruitment and lymphocyte homing. **Immunity**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 115–126, 2001. DOI: 10.1016/S1074-7613(01)00166-2.

HOSHINO, K. KAISHO, T; IWABE, T; TAKEUCHI, O; AKIRA, S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. **Int Immunol**, v. 14, n. 10, p. 1225-31, Oct 2002. ISSN 0953-8178

HOSHINO, K; TAKEUCHI, O; KAWAI, T; SANJO, H; OGAWA, T; YAKEDA, Y; TAKEDA, K; AKIRA, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **J Immunol**, v. 162, n. 7, p. 3749-52, Apr 1 1999. ISSN 0022-1767

INSTITUTE FOR QUALITY AND EFFICIENCY IN HEALTH CARE (IQWiG). What are the organs of the immune system? Cologne, Germany. 30 Nov 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279395/>>

JIANG, Q; AKASHI, S; MIYAKE, K; PETTY, H, R. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. **J Immunol**, v. 165, n. 7, p. 3541-4, Oct 1 2000. ISSN 0022-1767

JONES, A. J. S.; PAPAC, D. I.; CHIN, E. H.; KECK, R; BAUGHMAN, S. A.; LIN, Y. S.; KNEER, J; BATTERSBY, J. E. Selective clearance of glycoforms of a complex glycoprotein pharmaceutical caused by terminal N-acetylglucosamine is similar in humans and cynomolgus monkeys. **Glycobiology**, England, v. 17, n. 5, p. 529–540, 2007. DOI: 10.1093/glycob/cwm017.

KAISHO, T; TAKEUCHI, O; KAWAI, T; HOSHINO, K; AKIRA, S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. **J Immunol**, v. 166, n. 9, p. 5688-94, May

1 2001. ISSN 0022-1767 KANEKO, Y; NIMMERJAHN, F; RAVETCH, J. V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. **Science (New York, N.Y.)**, United States, v. 313, n. 5787, p. 670–673, 2006. DOI: 10.1126/science.1129594.

KAWAHARA, R; SAAD, J; ANGELI, C. B; PALMISANO, G. Site-specific characterization of N-linked glycosylation in human urinary glycoproteins and endogenous glycopeptides. **Glycoconj J**, v. 33, n. 6, p. 937-951, Dec 2016. ISSN 1573-4986

KAWAHARA, R; SAAD, J; COLLI, W; ALVES, M. J, M; PALMISANO, G. Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi* and mass spectrometry-based strategies for glycan and glycoprotein characterization. *In: Protozoan Parasitism: From Omics to Prevention and Control*. [s.l: s.n.]. DOI: 10.21775/9781910190838.03.

KAWAI, T; ODACHI, O; OGATA, T; TAKEDA, K; AKIRA, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**, v. 11, n. 1, p. 115-22, Jul 1999. ISSN 1074-7613

KHAN, J. A; BRINT, E. K; O'NEILL, L. A. J; TONG, L. Crystal structure of the Toll/interleukin-1 receptor domain of human IL-1RAPL. **J Biol Chem**, v. 279, n. 30, p. 31664-70, Jul 23 2004. ISSN 0021-9258

LEULIER, F; RODRIGUEZ, A; KHUSH, R. S; ABRAMS, J. M; LEMAITRE, B. The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. **EMBO Rep**, v. 1, n. 4, p. 353-8, Oct 2000. ISSN 1469-221X

LI, J; HSU, H; DING, Y; LI, H; WU, Q; YANG, P; LUO, B; ROWSE, A. L; SPALDING, D.M.; JR, S.L.B; MOUNTZ, J.D. Inhibition of fucosylation reshapes inflammatory macrophages and suppresses type II collagen-induced arthritis. **Arthritis and Rheumatology**, [S. l.], v. 66, n. 9, p. 2368–2379, 2014. DOI: 10.1002/art.38711.

LI, R; QIAO, S; CHEN, X. X; XING, G; LI, X; ZHANG, G. Vesicular stomatitis virus glycoprotein suppresses nuclear factor kappa-B- and mitogen-activated protein kinase-mediated pro-inflammatory responses dependent on sialic acids. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 152, p. 828–833, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.322.

LIANG, W; MAO, S; SUN, S; LI, M.; LI, Z; YU, R; MA,T; GU, J; ZHANG, J; TANIGUCHI, N; LI, W. Core fucosylation of the T cell receptor is required for T cell activation. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, n. JAN, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00078.

LISOWSKA, E. Protein Glycosylation, an Overview. **eLS**, 2008. ISSN 9780470015902. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0006211.pub2> >. Acesso em: 2018/09/24.

LORD, K. A; HOFFMAN-LIEBERMANN, B; LIEBERMANN, D. A. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. **Oncogene**, v. 5, n. 7, p. 1095-7, Jul 1990.

MA, B; SIMALA-GRANT, J. L; TAYLOR, D. E. **Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes***Glycobiology*, 2006. DOI: 10.1093/glycob/cwl040.

MEDZHITOV, R; RURLBURT, P. P; KOOP, E; CHEN, C; GHOSH, S; JANEWAY JR, C. A; MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. **Mol Cell**, v. 2, n. 2, p. 253-8, Aug 1998. ISSN 1097-2765

MIYOSHI, E; MORIWAKI, K; NAKAGAWA, T. **Biological function of fucosylation in cancer biology***Journal of Biochemistry*, 2008. DOI: 10.1093/jb/mvn011.

MIYOSHI, J; YAJIMA, T; OKAMOTO, S; MATSUOKA, K; INOUE, N; HISAMATSU, T; SHIMAMURA, K; NAKAZAWA, A; KANAI, T; OGATA, H; IWAO, Y; MUKAI, M; HIBI, T. Ectopic expression of blood type antigens in inflamed mucosa with higher incidence of FUT2 secretor status in colonic Crohn's disease. **Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. 1056–1063, 2011. DOI: 10.1007/s00535-011-0425-7.

MUZIO, M; NI, J; FENG, P; DIXIT, V.M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. **Science**, v. 278, n. 5343, p. 1612-5, Nov 28 1997. ISSN 0036-8075

OEFNER, C. M; WINKLER, A; HESS, C; LORENZ, A. K; HOLECSKA, V; HUXDORF, M; SCHOMMARTZ, T; PETZOLD, D; BITTERLING, J; SCHOEN, A. L; STOEHR, A. D; VAN, D. V; DARCAN-NIKOLAISEN, Y; BLANCHARD, V; SHMUDDE, I; LAUMOUNNIER, Y; STROVER, H. A; HEGAZY, A. N; EIGLMEIER, S; SCHOEN, C. T; MERTES, M. M. M; LODDENKEMPER, C; LÖHNING, M; KÖNIG, P; PETERSEN, A; LUGER, E.O; COLLIN, M.; KÖHL, J; HUTLOFF, A; HAMELMANN, E; BERGER, M.; WARDEMANN, H; EHLERS, M. Tolerance induction with T cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [S. l.], v. 129, n. 6, p. 1647–1655.e13, 2012. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.02.037.

OKADA, M; CHIKUMA, S; KONDO, T; HIBINO, S; MACHIYAMA, H; YOKOSUKA, T; NAKANO, M; YOSHIMURA, A. Blockage of Core Fucosylation Reduces Cell-Surface Expression of PD-1 and Promotes Anti-tumor Immune Responses of T Cells. **Cell Reports**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 1017–1028, 2017. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.027.

OSHIUMI, H; MATSUMOTO, M.; FUNAMI, K; AKAZAWA, T; SEYA, T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. **Nat Immunol**, v. 4, n. 2, p. 161-7, Feb 2003. ISSN 1529-2908

PICARD, C; CASANOVA, J. L; PUEL, A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I $\kappa$ B $\alpha$  deficiency. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 3, p. 490-7, Jul 2011. ISSN 1098-6618

POLTORAK, A; HE, X; SMIRNOVA, I; LIU, M. Y; HUFFEL, C. V; DU, X; BIRDWELL, D; ALEJOS, E; SILVA, M; GALANOS, C; FREUDERNBERG, M; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P; LAYTON, B; BEULER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-8, Dec 11 1998. ISSN 0036-8075

QURESHI, S. T; LARIVIÈRE, L; LEVEQUE, G; CLERMONT, S; MOORE, K. J; GROS, P; MALO, D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). **J Exp Med**, v. 189, n. 4, p. 615-25, Feb 15 1999. ISSN 0022-1007

ROTH, J; ZUBER, C; PARK, S; JANG, I; LEE, Y; KYSELA, K.G ; FOURN, V. L.; SANTIMARIA, R; GUHL, B; CHO, J. W. Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. **Mol Cells**, v. 30, n. 6, p. 497-506, Dec 2010. ISSN 0219-1032.

SARRATS, A; SALDOVA, R; PLA, E; FORT, E; HARVEY, D. J.; STRUWE, W. B.; DE LLORENS, R; RUDD, P. M.; PERACAULA, Rosa. Glycosylation of liver acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. **Proteomics - Clinical Applications**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 432–448, 2010. DOI: 10.1002/prca.200900150.

SATO, R; SHIBATA, T; TANAKA, Y; KATO, C; YAMAGUCHI, K; FURUKAWA, Y; SHIMIZU, E; YAMAGUCHI, R; IMOTO, S; MIYANO, S; MIYAKE, K. Requirement of glycosylation machinery in TLR responses revealed by CRISPR/Cas9 screening. **International Immunology**, [S. l.], v. 29, n. 8, p. 347–355, 2017. DOI: 10.1093/intimm/dxx044.

SCANGA, C. A; ALIBERTI, J; JANKOVIC, D; TILLOY, F; BENNOUNA, S; DENKERS, E.Y; MEDZHITOV, R; SHER, A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **J Immunol**, v. 168, n. 12, p. 5997-6001, Jun 15 2002. ISSN 0022-1767

SCHACHTER, H. Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins. **Cell Mol Life Sci**, v. 58, n. 8, p. 1085-104, Jul 2001. ISSN 1420-682X

SCHNARE, M; BARTON, G. M; HOLT, A. C; TAKEDA, K.; AKIRA, S; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. **Nat Immunol**, v. 2, n. 10, p. 947-50, Oct 2001. ISSN 1529-2908

SCHWAB, I; NIMMERJAHN, F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 176–189, 2013. DOI: 10.1038/nri3401.

SHRIMAL, S; CHEREPANOVA, N. A.; GILMORE, Reid. Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. **Seminars in cell & developmental biology**, [S. l.], v. 41, p. 71–78, 2015. DOI: 10.1016/j.semcd.2014.11.005.

SIVICK, K. E; ARPAIA, N; REINER, G.L; LEE, B. L; RUSSELL, B.R; BARTON, G.M. Toll-like receptor-deficient mice reveal how innate immune signaling influences Salmonella virulence strategies. **Cell Host Microbe**, v. 15, n. 2, p. 203-13, Feb 12 2014. ISSN 1934-6069

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, n. 4, p. 43R-56R, Apr 2002. ISSN 0959-6658

STAHL, P. D. The mannose receptor and other macrophage lectins. **Current opinion in immunology**, England, v. 4, n. 1, p. 49–52, 1992. DOI: 10.1016/0952-7915(92)90123-v.

STEENTOFT, C; VAKHRUSHEV, S. Y; JOSHI, H. J; KONG, Y; VESTER-CHRISTENSEN, M. B; SCHJOLDAGER, K. T. G.; LAVRSEN, K; DABELSTEEN, S; PEDERSEN, N. B; MARCOS-SILVA, L; GUPTA, R; BENNETT, E.P; MANDEL, U; BRUNAK, S; WANDALL, H. H.; LEVERY, S. B; CLAUSEN, H. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **The EMBO journal**, [S. l.], v. 32, n. 10, p. 1478–1488, 2013. DOI: 10.1038/emboj.2013.79.

SUZUKI, N; SUZUKI, S; DUNCAN, G. S; MILLAR, D. G.; WADA, T; MIRTSOS, C; TAKADA, H; WAKEHAM, A; ITIE, A; LI, S; PENNINGER, J. M; WESCHE, H; OHASHI, P.S ; MAK, T. W; YEH, W. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. **Nature**, v. 416, n. 6882, p. 750-6, Apr 18 2002. ISSN 0028-0836

TAKEDA, J; MIYATA, T; KAWAGOE, K; ILDA, Y; ENDO, Y; FUJITA, T; TAKAHASHI, M; KITANI, T; KINOSHITA, T. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Cell**, v. 73, n. 4, p. 703-11, May 21 1993. ISSN 0092-8674

TAKEDA, K; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int Immunol**, v. 17, n. 1, p. 1-14, Jan 2005. ISSN 0953-8178

TAKEDA, K; KAISHO, T; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 335-76, 2003. ISSN 0732-0582

TAKEUCHI, O; HOSHINO, K; AKIRA, S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. **J Immunol**, v. 165, n. 10, p. 5392-6, Nov 15 2000. ISSN 0022-1767

TOMITA, M. Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Biochim Biophys Acta**, v. 1455, n. 2-3, p. 269-86, Oct 8 1999. ISSN 0006-3002

XIANG, W; CHAO, Z. Y; FENG, Du Yi. Role of Toll-like receptor/MYD88 signaling in neurodegenerative diseases. **Reviews in the Neurosciences**, [S. l.], 2015. DOI: 10.1515/revneuro-2014-0067.

WANG, J. Q; JEELALL, Y. S; FERGUSON, L. L; HORIKAWA, K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. **Front Immunol**, v. 5, p. 367, 2014. ISSN 1664-3224

YAROVINSKY, F; ZHANG, D; ANDERSEN, J. F; BANNENBERG, G. L; SERHAN, C. N.; HAYDEN, M. S; HIENY, S; SUTTERWALA, F. S; FLAVELL, R. A; GHOSH, S; SHER, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1626-9, Jun 10 2005. ISSN 1095-9203

## ANEXO



Universidade de São Paulo  
**Comissão de Ética no  
 Uso de Animais**

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "A relação entre o adaptador imunológico MyD88 e a glicosilação de proteínas.", protocolada sob o CEUA nº 6931291118, sob a responsabilidade de **Giuseppe Palmisano e equipe; Cláudio R. F. Marinho; Joyce Silva Saad; Erika Paula Machado Peixoto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 06/05/2019.

We certify that the proposal "The discovery of a new biological link between immunological adaptor MyD88 and protein glycosylation.", utilizing 4 Genetically modified mice (GMO) (4 males), 4 Isogenics mice (4 males), protocol number CEUA 6931291118, under the responsibility of **Giuseppe Palmisano and team; Cláudio R. F. Marinho; Joyce Silva Saad; Erika Paula Machado Peixoto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 05/06/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **12 meses**

Depto/Setor: **Parasitologia**

Origem: **Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia**

Espécie: **Camundongo geneticamente modificado (OGM)**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **8 a 10 semanas**

Linhagem: **C57BL/6**

**N amostral: 4**

Origem: **Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **8 a 10 semanas**

Linhagem: **C57BL/6**

**N amostral: 4**

São Paulo, 04 de maio de 2020

Prof. Dra. Luciane Valéria Sita  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni  
 Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III / Cidade Universitária, Butantã - CEP 05508-000 - São Paulo/SP - tel: 55 (11) 3091-7733  
 Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8 às 16h - e-mail: cep@icb.usp.br  
 CEUA N 6931291118

25/06/2020

Data e assinatura do orientador(a)