



**ERIKA APARECIDA OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO *in silico* DE PADRÕES MOLECULARES  
ASSOCIADOS AO DANO (DAMPs) E SEUS RECEPTORES EM  
SERES HUMANOS**

**LAVRAS-MG  
2019**

**ERIKA APARECIDA OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO *in silico* DE PADRÕES MOLECULARES  
ASSOCIADOS AO DANO (DAMPs) E SEUS RECEPTORES EM  
SERES HUMANOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Alterações Metabólicas, Inflamação e Alimentos Funcionais, para obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Ana Paula Peconick  
Orientadora

Prof. Dr. Luciano José Pereira  
Profa. Dra. Laura Cristina Jardim Porto  
Coorientadores

**LAVRAS-MG  
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, Erika Aparecida.

Avaliação *in silico* de padrões moleculares associados ao dano (damps)  
e seus receptores em seres humanos / Erika Aparecida Oliveira. - 2019.  
84 p.

Orientador(a): Ana Paula Peconick.

Coorientador(a): Luciano José Pereira, Laura Cristina Jardim Porto.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras,  
2019.

Bibliografia.

1. Bioinformática. 2. Sistema imunológico. 3. mRNA. I. Peconick, Ana  
Paula. II. Pereira, Luciano José. III. Porto, Laura Cristina Jardim. IV. Título.

**ERIKA APARECIDA OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO *in silico* DE PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS AO DANO  
(DAMPs) E SEUS RECEPTORES EM SERES HUMANOS**

***In silico* ASSESSMENT OF DAMAGE ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS  
(DAMPs) AND THEIR RECEPTORS HUMANS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Alterações Metabólicas, Inflamação e Alimentos Funcionais, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de março de 2019

Dra. Kiyoko Uemura Utiumi - UNILAVRAS  
Dra. Renata de Carvalho Foureaux-UNILAVRAS  
Dr. Rodrigo Ferreira de Moura - UFLA

Profa. Dra. Ana Paula Peconick  
Orientadora

Prof. Dr. Luciano José Pereira  
Profa. Dra. Laura Cristina Jardim Porto  
Coorientadores

**LAVRAS-MG  
2019**

*Aos meus pais, Lúcia e Roque, a quem devo tudo que sou*

*Aos meus filhos, Marina e Matheus, por me ensinarem a ser cada dia melhor*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter permitido que eu conviva com grandes pessoas que me ensinam muito a cada dia.

À minha família abençoada, que sempre vibra com minhas vitórias.

Aos meus pais, Roque e Lúcia, que eu amo muito e que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, por cuidarem dos meus filhos com tanto afeto para que eu pudesse vencer mais esta etapa da minha vida, pelo seu amor incondicional.

À minha amada irmã e amiga, Simone, por seu apoio, companheirismo e cumplicidade.

Aos meus amados filhos, Marina e Matheus, por encherem minha vida de alegria.

Ao meu marido Carlos, pela compreensão das horas não convividas.

Aos meus avós, *in memoriam*, Marta e Sebastião, por sempre terem me apoiado e pelo afeto e aconchego que jamais esquecerei.

À Eliana (DZO), por todo apoio, carinho e incentivo, pois esta conquista também é sua.

Ao técnico William (Fisiologia), por compartilhar sua sabedoria comigo.

Ao prof. Raimundo, *in memoriam*, por todo aprendizado ao longo de 20 anos.

À Rosana, Sônia e Fátima, ambas do DMV, pela amizade.

À Dirlene (secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde) pela boa vontade em esclarecer todas as minhas dúvidas.

À Priscila Cotta Palhares, por nossa incrível amizade, por nossas conversas e desabafos.

À minha querida amiga Lílian Rios, por sempre torcer por mim.

À Laura (DNU), pelo apoio, amizade e incentivo.

À Janina pela ajuda no decorrer do curso e amizade para vida toda.

À Jéssica, mais uma amiga que o mestrado me trouxe.

Ao Thales e Carlos Cardon (Fisiologia Vegetal), pela disponibilidade em ajudar.

Ao Lucas Januzzi, pela ajuda para desenvolver esse trabalho.

À Rebeca, minha parceira, pela amizade e ajuda em todas as análises.

Ao professor Rodrigo (DSA) pelos links de cursos de bioinformática.

À Rafaella (Rafa) pela boa vontade em me ajudar com os programas de bioinformática.

À professora Elaine, pela disponibilidade em me esclarecer as dúvidas na execução das minhas análises.

Aos meus colegas de mestrado pela companhia ao longo da jornada.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade.

À CAPES, ao CNPq e FAPEMIG, pelo apoio.

A todos aqueles que me ajudaram de alguma forma.

À todas as pessoas difíceis que encontrei no caminho por me ensinarem exatamente como eu não devo ser.

À minha querida orientadora Ana Paula Peconick, pelo empenho, dedicação, amizade. Por ser sempre doce, com aquele sorriso estampado no rosto, por sempre entender as minhas dificuldades, meus tropeços. Nossa amizade já existia antes da orientação e agora ela se consolida. Agradeço a Deus por ele ter permitido que você fizesse parte da minha história. A você Ana, minha eterna gratidão e apreço!

*A fé é como uma luz, capaz de  
iluminar você até aos seus sonhos*  
(autor desconhecido)



## RESUMO

Os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) são moléculas intracelulares que são lançadas para o meio extracelular após lesão celular, e são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) e ativam o sistema imune inato, desencadeando resposta inflamatória. A resposta imune desencadeada por DAMPs é chamada de inflamação estéril por ser iniciada após trauma, isquemia, necrose celular, sem ação patogênica. Dentre os PRRs, estão o Receptor Toll-like (TLRs), o Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGEs), Receptor de Interleucina 1 (IL1R1), Receptor Nod-like (NLRs) e Receptor Ausente no Melanoma 2 (AIM-2). Esses PRRs são expressos em macrófagos, células dendríticas e em várias outras células de defesa, e desencadeiam cascatas de sinalização, como a ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), interferon I (IFN-I), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), induzindo a transcrição de genes para expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas importantes na resposta imunológica. Dentre os DAMPs mais comumente citados encontram-se as proteínas S100, as Proteínas de Choque Térmico (HSPs) e o Grupo Box de Alta Mobilidade 1 (HMGB1). Essas moléculas encontram-se intimamente envolvidas na etiopatogenia de doenças crônicas como câncer, diabetes, hepatopatias, cardiopatias; e doenças neurodegenerativas. Nesse contexto, a criação de marcadores específicos que viabilizem a montagem de ensaios biológicos, com vistas à elucidação dos mecanismos moleculares implícitos nessas enfermidades, assume grande relevância. Assim, com o auxílio da bioinformática, o presente trabalho investigou diferentes DAMPs humanos e seus receptores, obtendo suas sequências de aminoácidos, predição de energia livre, predição de antigenicidade de epítomos, análise de similaridade e desenhos de *primers* com potencial de amplificar sequências alvos. Os resultados apresentados são promissores e poderão ser utilizados como imunomoduladores ou como plataformas de diagnóstico e prognóstico em várias enfermidades.

Palavras-chave: Bioinformática; Sistema imunológico; Doenças; mRNA

## ABSTRACT

Damage associated molecular patterns (DAMPs) are intracellular molecules that are released into the extracellular environment after cell damage, and are pattern recognition receptors (PRRs) and activate the innate immune system, triggering an inflammatory response. The immune response triggered by DAMPs is called sterile inflammation because it is initiated after trauma, ischemia, cellular necrosis, without pathogenic action. Among the PRRs are the Toll-like Receptor (TLRs), the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGEs), Interleukin 1 Receptor (IL1R1), Nod-like Receptor (NLRs), and Melanoma 2 Absent Receptor (AIM-2). These PRRs are expressed in macrophages, dendritic cells and in several other defense cells, and trigger signaling cascades, such as activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK), interferon I (IFN- I), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), inducing transcription of genes for expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines important in the immune response. Among the most commonly mentioned DAMPs are S100 proteins, Heat Shock Proteins (HSPs) and the High Mobility Box Group 1 (HMGB1). These molecules are closely involved in the etiopathogenesis of chronic diseases such as cancer, diabetes, liver disease, heart disease; and neurodegenerative diseases. In this context, the creation of specific markers that allow the assembly of biological assays, with a view to elucidating the molecular mechanisms implicit in these diseases, is of great relevance. Thus, with the aid of bioinformatics, the present work investigated different human DAMPs and their receptors, obtaining their amino acid sequences, free energy prediction, prediction of epitope antigenicity, similarity analysis and primer designs with the potential to amplify target sequences. The results presented are promising and could be used as immunomodulators or diagnostic and prognostic platforms in various diseases.

Keywords: Bioinformatics; Immune system; Diseases; mRNA

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	_ RAGE: Predição de energia livre mínima mRNA.....	57
Tabela 2	_ TLR: Predição de energia livre mínima mRNA.....	57
Tabela 3	_ IL1R1: Predição de energia livre mínima mRNA.....	58
Tabela 4	_ AIM2 e NLRs: Predição de energia livre mínima mRNA.....	59
Tabela 5	_ HSP HIKESHI e HSP 10: Predição de energia livre mínima mRNA.....	59
Tabela 6	_ HSP 40: Predição de energia livre mínima mRNA.....	60
Tabela 7	_ HSP 60: Predição de energia livre mínima mRNA.....	61
Tabela 8	_ HSP 70: Predição de energia livre mínima mRNA.....	62
Tabela 9	_ HSP 90: Predição de energia livre mínima mRNA.....	62
Tabela 10	_ HSP 110: Predição de energia livre mínima mRNA.....	63
Tabela 11	_ HSP B: Predição de energia livre mínima mRNA.....	63
Tabela 12	_ HMGB1: Predição de energia livre mínima mRNA.....	63
Tabela 13	_ S100: Predição de energia livre mínima mRNA.....	64
Tabela 14	_ RAGE, TLR, ILR-1: Predição de antigenicidade de epítomos.....	65
Tabela 15	_ AIM2 e NLRs: Predição de antigenicidade de epítomos.....	65
Tabela 16	_ HMGB1, HIKESHI, HSPs 10 e 60: Predição de antigenicidade de epítomos.....	66
Tabela 17	_ HSP 40: Predição de antigenicidade de epítomo.....	66
Tabela 18	_ HSP 70: Predição de antigenicidade de epítomos.....	67
Tabela 19	_ HSP 90, HSP 110 e HSP B: Predição de antigenicidade de epítomos.....	68
Tabela 20	_ S100: Predição de antigenicidade de epítomos.....	69
Tabela 21	_ Receptores: Desenho de <i>Primer</i> .....	70
Tabela 22	_ HMGB1 e HSP: Desenho de <i>Primer</i> .....	71
Tabela 23	_ HSP: Desenho de <i>Primer</i> .....	72
Tabela 24	_ S100: Desenho de <i>Primer</i> .....	73

Tabela 25	_ Validação <i>primers</i> de receptores.....	74
Tabela 26	_ Validação <i>primers</i> HMGB1, HSP10 e HSP40.....	75
Tabela 27	_ Validação <i>primers</i> HSP60, HSP70, HSP90, HSP110 e HSPB.....	76
Tabela 28	_ Validação <i>primers</i> S100.....	76

## LISTA DE SIGLAS

AGE	Advanced Glycation Endproducts
AIM2	Absent in Melanoma 2
APC	Antigen-presenting Cells
A/T	Adenina/Timina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BIR	Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAPES	Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CD	Células Dendríticas
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX	Cicloxygenase
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
F/R	Forward/Reverse
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
GC	Guanina/Citosina
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HSPs	Heat Shock Proteins
IFN	Interferon
IL-18	Interleucina 18
IL-1 $\beta$	Interleucina 1- <i>beta</i>
Il-6	Interleucina 6
IL1R1	Interleukin-1 Receptor
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
Kda	Kilodaltons
MAMPs	Microbe-Associated Molecular Pattern
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MFE	Minimum Free Energy
MyD-88	Myeloid Differentiation Primary Response 88
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa-B
NK	Natural Killer
NLR	NOD-like Receptors
NLRC	NOD-like Receptors family CARD Domain
NLRC4	NOD-like Receptors family CARD domain containing 4
NLRC5	NOD-like Receptors family CARD domain containing 5
NLRP	NOD-like Receptors Pyrin Domain
NLRP1	NOD-like Receptors Pyrin Domain Containing 1
NLRP3	NOD-like Receptors Pyrin Domain Containing 3
NOD	Nucleotide-Binding and Oligomerization Domain
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
Pb	Pares de Base
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PRRs	Pattern Recognition Receptors
PYD	Pyrin Domain
RAGEs	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RefSeq	Banco de Dados de Sequências de Referência
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Reactive Oxygen Species
Ta	Temperatura de Anelamento
TLRs	Toll-like Receptors
Tm	Temperatura de Melting
TNF	Tumor Necrosis Factor

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS AO DANO (DAMPs)</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÃO (PRRS)</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.1 Receptores Toll-like (TLRs)</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.2 Receptor de Interleucina-1 (IL1R1)</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.3 Receptores Nod-Like (NLRs) e Receptor de Domínios de Oligonização e Nucleotídeo (NOD)</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2.4 Receptor Ausente no Melanoma 2 (AIM2)</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2.5 Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGEs)</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3 INFLAMOSSOMA</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3.1 NLRP3</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3.2 AIM2</b> .....	<b>26</b>
<b>2.4. SUBSTÂNCIAS QUE SÃO RECONHECIDAS COMO DAMPs</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4.1 Proteínas S100</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4.2 Proteínas de Choque Térmico (HSP)</b> .....	<b>30</b>
<b>2.4.3 Grupo Box de Alta Mobilidade 1 (HMGB-1)</b> .....	<b>32</b>
<b>3 BIOINFORMÁTICA</b> .....	<b>33</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>35</b>
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	<b>41</b>
<b>SELEÇÃO IN SILICO DE PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS AO DANO (DAMPs) E SEUS RECEPTORES EM SERES HUMANOS</b> .....	<b>41</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

A resposta imune inata representa um sistema de menor especificidade de defesa imunológica. As principais células envolvidas nesse processo são os neutrófilos, fagócitos mononucleares, eosinófilos, mastócitos, células natural killer e células dendríticas. A imunidade inata pode ser ativada de forma exógena, por agentes patogênicos através dos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs); e por duas formas endógenas, sendo uma delas através de um desequilíbrio provocado por um agente estressor onde as bactérias da microbiota intestinal são reconhecidas como estranhas através dos padrões moleculares associados à microbiota comensal (MAMPs), e através de moléculas endógenas produzidas ou liberadas de células danificadas, sendo denominados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Os DAMPs são moléculas endógenas que, em condições de lesão celular, são liberadas no meio extracelular por células necróticas e matriz extracelular, e desencadeiam resposta inflamatória através da ativação do sistema imune (FLESHNER, 2013; PATIDAR et al., 2018; SRIKRISHNA; FREEZE, 2009).

Os DAMPs se ligam aos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR), como os Receptores Toll-like (TLRs), presentes na membrana plasmática e endossoma das células apresentadoras de antígeno, o Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGEs), Receptor de Interleucina-1 (IL1R1), os Receptores Nod-like (NLRs), dentre os quais se destaca o Receptor de Domínios de Oligonização e Nucleotídeo (NOD) e o Receptor Ausente no Melanoma-2 (AIM2). Esse processo inicialmente estimula a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias (NAKAHIRA; HISATA; CHOI, 2015; SHAO et al., 2017; TURNER, 2016).

Estudos revelam o envolvimento íntimo dos DAMPs à patogênese de doenças crônicas como diabetes, câncer, cardiopatias, hepatopatias, obesidade, doenças neurodegenerativas, doença periodontal, dentre outras. Como exemplos de DAMPs existem as Proteínas S100, Proteínas de Choque Térmico (HSPs) e Grupo Box de Alta Mobilidade 1 (HMGB1) (FLESHNER, 2013; IWATA; OTA; DUMAN, 2013; KURAMOCHI et al., 2016; NAKAHIRA; HISATA; CHOI, 2015; RANI et al., 2017; SHAO et al., 2017; TURNER, 2016).



Os PRRs são compostos por várias famílias, que ativam o sistema imune inato diante dos agentes nocivos. Os TLRs, os mais bem elucidados, apresentam domínios conservados, o que facilita sua análise a nível computacional. O IL1R1 é especificamente ativado por duas isoformas de interleucina 1, que são IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Os NLRs são proteínas citoplasmáticas que reconhecem DAMPs e influenciam na montagem dos inflamossomos, assim como os AIM2. Os RAGEs são imunoglobulinas (Ig), que realizam uma importante função na ativação da resposta imune inata, ligando-se aos mais variados DAMPs. O inflamossoma NLRP3 é o mais bem estudado dentre os inflamossomas e desempenha um importante papel na expansão da resposta inflamatória estéril (BONGARZONE et al., 2017; DIAS; MACTAVISCH; CRUZ, 2015; IWATA; OTA; DUMAN, 2013; TURNER, 2016).

Tendo em vista a variabilidade de DAMPs e o envolvimento de fatores ambientais estressantes, além dos fatores fisiológicos comuns, como o processo de envelhecimento, na intrincada rede de resposta imunológica, torna-se imprescindível a análise genômica desses componentes, comparando suas estruturas, bem como a relação com diversas doenças, no intuito de estabelecer padrões diagnósticos e/ou terapêuticos.

Neste contexto, no âmbito da análise genômica citada acima, a bioinformática vem como uma importantíssima ferramenta para elucidação das questões relacionadas aos DAMPs. A bioinformática é uma linha de pesquisa de caráter multidisciplinar que utiliza ferramentas computacionais para analisar dados genômicos, bioquímicos e moleculares, combinando inovações técnicas e científicas de diversas áreas do conhecimento como a ciência da computação, química, estatística e a biologia molecular (PROSDOCIMI, 2007a).

Esta ferramenta surgiu nos anos 80 e sua demanda nos dias atuais cresce de forma exponencial devido ao grande número de sequenciamentos de nova geração existente, sendo então utilizada para análises *in silico* de dados biológicos, que ocorrem de forma matemática utilizando os algoritmos. A bioinformática tem se apresentado como ferramenta de estudo indispensável para os profissionais de saúde, graças às enormes descobertas e à evolução no âmbito da biomedicina, sendo de extrema valia no que concerne ao progresso da ciência (ARAÚJO et al., 2008; CAO et al., 2018; POLAND et al., 2013; SORIA-GUERRA et al., 2015).

Nesse contexto, a identificação de marcadores específicos que viabilizem a montagem de ensaios biológicos, com vistas à elucidação dos mecanismos moleculares implícitos em enfermidades, assume grande relevância. Assim, com o auxílio da bioinformática, o presente trabalho investigou diferentes DAMPs humanos e seus receptores, obtendo suas sequências de

aminoácidos, predição de energia livre para formação de estrutura secundária proteica, predição de antigenicidade de epítomos, análises de similaridade e desenho de *primers*. Os *primers* tem potencial de amplificar sequências alvos que poderão ser utilizados em plataformas de diagnóstico ou como imunomoduladores.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs)

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do organismo a agentes agressores desde a antiguidade e o processo inflamatório agudo, que se caracterizava por feridas e infecções, podia ser reconhecido através dos sinais cardinais da inflamação, “*rubor et tumor cum calore et dolore*” descritos por Cornelius Celsus, médico romano, no século I. Somente no século XIX, no ano de 1858, o médico polonês Rudolph Virchow, considerado o pai da patologia moderna e da medicina social, acrescentou o quinto sinal cardinal da inflamação, *functio laesa* (perturbação da função) sendo este considerado o único sinal universal da inflamação (VAN LINTHOUT; TSCHÖPE, 2017).

Esta resposta inflamatória desencadeada pela imunidade inata pode ser iniciada por diferentes formas: de forma exógena, através do reconhecimento de estruturas moleculares dos microrganismos patogênicos denominados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs); e por duas formas endógenas, sendo uma delas através de um desequilíbrio provocado por um agente estressor onde as bactérias da microbiota intestinal são reconhecidas como estranhas através dos padrões moleculares associados à microbiota comensal (MAMPs), e através de moléculas endógenas produzidas ou liberadas de células danificadas, sendo denominados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Estes “padrões” se ligam aos PRRs, expressos na membrana plasmática ou membrana endossomal e citoplasma de vários tipos celulares, que por sua vez, ativam mecanismos específicos de defesa. A resposta inflamatória é, então, mediada pela ativação do sistema imunológico, que recruta leucócitos para a região lesionada, como os neutrófilos, monócitos, células *Natural Killer* (NK) e células dendríticas (CD), integrantes do sistema imune inato (FLESHNER, 2013; SRIKRISHNA; FREEZE, 2009).

DAMPs são moléculas intracelulares que são lançadas para o meio extracelular após lesão celular asséptica causada por diversos mecanismos, sendo reconhecidas por PRRs, como o TLRs, RAGEs, IL1R1, NLRs com destaque para NOD e AIM2. Essa ligação ativa o sistema imune inato, iniciando uma resposta inflamatória aguda, orquestrada por citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1). Este tipo de resposta é chamado de inflamação estéril por iniciar-se após trauma, isquemia,

ou outro dano sem ação patogênica. No entanto, essa resposta pode evoluir e associar-se a várias complicações caso ocorra de forma exacerbada (FLESHNER, 2013; IWATA; OTA; DUMAN, 2013; KURAMOCHI et al., 2016; NAKAHIRA; HISATA; CHOI, 2015; RANI et al., 2017; SHAO et al., 2017; TURNER, 2016).

## **2.2 Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs)**

Os PRRs são compostos por várias famílias, que alertam o sistema imune inato sobre os agentes nocivos. Dentre estas famílias estão os TLRs, compostos por domínios extracelulares, transmembranares e citoplasmáticos, sendo estes a família de PRRs melhor caracterizada; os IL1R1 que reconhecem IL-1  $\alpha$  e IL-1  $\beta$ ; os NLRs, conjunto de receptores intracelulares situados no citosol compostos por vários domínios; os receptores AIM2 e os RAGEs. Os PRRs são expressos em macrófagos, células dendríticas e em várias outras células de defesa, sendo capazes de desencadear cascatas de sinalização que envolve o fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), o interferon I (INF-1) e a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) induzindo, dessa forma a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas importantes na resposta imunológica (DIAS; MACTAVISCH; CRUZ, 2015; FLESHNER, 2013; SHIN et al., 2015).

### **2.2.1 Receptores Toll-like (TLRs)**

Os receptores toll-like, descobertos na década de 90, são importantes reguladores do sistema imune inato. São receptores conservados, da linhagem germinativa, que reconhecem padrões como PAMPs e DAMPs. Eles expressam 10 genes diferentes em seres humanos, cada um realizando diferentes funções na resposta imune. Os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 são glicoproteínas transmembranares de tipo 1 que contém motivos de repetição ricos em leucina, motivos estes que agem como mediadores na ligação do ligante e um domínio citoplasmático altamente conservado, e todos se ligam a moléculas adaptadoras a jusante. Os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 encontram-se no interior da célula, nas membranas lisossômicas e endossomais. Os TLRs reconhecem uma grande variedade de sinais de perigo ou dano, como peptídeos, proteínas, fragmentos de nucleotídeos, calor, oxidação, e vários outros sinais (DIAS; MACTAVISCH; CRUZ, 2015; GRISHMAN; WHITE; SAVANI, 2012).

Após estimulação, os TLRs podem formar complexos de sinalização homodiméricos ou heterodiméricos, entre eles como, por exemplo, TLR1-TLR2 e TLR2-TLR6, ou com outro TLR idêntico como TLR3-TLR3; ou com RAGE, e também podem interagir com co-receptores como CD14 e MD2. A sinalização intracelular é mediada por proteínas adaptadoras pró-inflamatórias como o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), com exceção do TLR3 que se liga a outro tipo de proteína adaptadora, designada como *domain-containing adapter inducing IFN-beta*(TIR), formando o complexo *TIR-domain-containing adapter inducing IFN-beta*(TRIF). O TLR4 é o único receptor que pode ativar, simultaneamente, as duas vias de sinalização, dependentes de MyD88 e/ou TRIF. Os TLRs ativados desencadeiam uma cascata de sinalização que envolve o recrutamento de outras proteínas adaptadoras pró-inflamatórias. Após a ativação dependente do receptor MyD88 da quinase 1/4 ativadora do receptor de IL-1 (IRAK-1/4), que culmina com a ativação via mitógeno ativador da proteína quinase (MAPK) e a translocação do NF- $\kappa$ Bp65 para o núcleo, este NF- $\kappa$ B promove a ativação transcricional de genes que codificam citocinas inflamatórias e quimiocinas, enquanto a via MAPK não só induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, mas também estimula a proliferação e sobrevivência celular. Esta complexidade contribui para as diferentes respostas a diversos DAMPs (DIAS; MACTAVISCH; CRUZ, 2015; GRISHMAN; WHITE; SAVANI, 2012; TOLLE; STANDIFORD, 2013).

### 2.2.2 Receptor de Interleucina-1 (IL1R1)

IL1R1 é especificamente ativado por duas isoformas de interleucina 1, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Existe uma semelhança entre a sinalização de TLR e IL1R1. A ligação da IL-1 ao seu receptor recruta a proteína acessória do receptor de IL-1(IL-1RacP), necessária à sinalização de IL-1. O IL1R1, assim como os TLRs, também recruta proteínas adaptadoras específicas como MyD88. Esse recrutamento facilita a ativação das IRAKs, o que resulta na estimulação de rotas de sinalização induzidos por estresse como, por exemplo, a sinalização das vias NF $\kappa$ B, JNK, p38 MAPK) e transcrição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, que elevam o fluxo sanguíneo, aumentam a migração das células de defesa e degradam matriz celular (TURNER, 2016).

### **2.2.3 Receptores Nod-Like (NLRs) e Receptor de Domínios de Oligonização e Nucleotídeo (NOD)**

Os NLRs compreendem 22 membros expressos em seres humanos, presentes nas células que fazem fagocitose. São proteínas citoplasmáticas que reconhecem DAMPs e modulam a montagem dos inflamossomos. Apresentam 3 domínios estruturais como o domínio C terminal, rico em repetições de leucina LRR);o domínio NACHT que é um domínio central de ligação a nucleotídeos (NOD) e um domínio efetor iniciador da sinalização, que pode ser CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*), PYD (*Pyrin Domain*) ou BIR (*Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat*) e são subdivididos em subfamílias como NLRC (*NOD-Like Receptors Family CARD Domain*) e NLRP (*NOD-Like Receptors Pyrin Domain*). Na subfamília de NLRCs, destacam-se os receptores de domínios de oligonização e nucleotídeo NOD1 e NOD2, que promovem a sinalização da inflamação através da via de ativação da quinase e da caspase. Na subfamília NLRPs, encontram-se o NLRP1 e o NLRP3, importantes ativadores de inflamossomas que compreendem a proteína adaptadora ASC e a caspase-1 (DIAS; MACTAVISCH; CRUZ, 2015; GAO et al., 2017).

### **2.2.4 Receptor Ausente no Melanoma 2 (AIM2)**

É um receptor não-NLR capaz de formar o inflamossomo. Faz parte da família Hin-200, e age como sensor, reconhecendo o DNA de cadeia dupla (dsDNA). O inflamossomo é formado pelas proteínas AIM2, caspase-1 e ASC, que é imprescindível para montar a ligação via domínio PYD-PYD, de AIM2 e caspase-1. Dessa forma, o inflamossomo é ativado de forma direta, através da ligação de DsDNA e AIM2, com oligomerização da ASC e caspase-1 (DIAS; MACTAVISCH; CRUZ, 2015).

### 2.2.5 Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGEs)

Este receptor transmembranar é um integrante da superfamília das imunoglobulinas (Ig), que realiza uma importante função na ativação da resposta imune inata e que reconhece os produtos finais de glicação avançada (AGE) e também produtos não AGE. Sua expressão, ao contrário dos TRLs, é baixa ou negativa em tecidos não lesionados, aumentando consideravelmente em processos inflamatórios. O complexo ligante-RAGE pode heterodimerizar com PM2 da integrina  $\beta 2$  e com TLRs, estimulando uma série de vias inflamatórias como o NF- $\kappa$ B, MAPKs, PI3K, JAK/STAT; acarretando a formação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e TNF (BONGARZONE et al., 2017; SHIN et al., 2015; SRIKRISHNA; FREEZE, 2009; TURNER, 2016; ZHANG et al., 2017; ZHU et al., 2018).

RAGE tem peso molecular de 35 kDa e apresenta 5 domínios dos quais, o domínio C-terminal, de localização citoplasmática e que induz a transdução de sinal; um domínio transmembranar, responsável pela ancoragem do receptor na membrana celular; dois domínios distintos, C1 e C2, que são constantes; e outro domínio variável, V, situado no N-terminal. O domínio V é onde ocorre a ligação da maioria dos ligantes como as proteínas S100 e AGEs, porém, o mecanismo de ligação entre alguns membros das proteínas S100 e RAGE ainda não está claro. Este domínio (V) apresenta diferentes versões desde RAGE V1 até RAGE V19. Assim que os ligantes se acoplam a RAGE, seu domínio citoplasmático sofre homodimerização. Ocorre autofosforilação e promoção de transdução de sinal intracelular a jusante. A transdução de sinal leva à inflamação, proliferação celular, migração e crescimento tumoral, acarretando em várias patologias como diabetes, neurodegeneração, inflamação vascular crônica e câncer. O tipo e a concentração dos ligantes, e o tipo celular onde houve a ligação, é que determinarão qual via será ativada (KHAN et al., 2018; SRIKRISHNA; FREEZE, 2009).

Pouco se conhece sobre o domínio transmembranar de RAGE, apenas que existe uma estrutura helicoidal contendo um motivo "GxxxG", que pode auxiliar na homodimerização helix-hélice do receptor, levando à hipótese do seu envolvimento na transdução de sinal. A cauda citoplasmática de RAGE composta por 42 aminoácidos apresenta três divisões sendo um domínio proximal composto por muitos aminoácidos básicos como Arg 366, Arg 368, Arg 369 e Glu371; um domínio central contendo ácido glutâmico e região de fosforilação em Ser391 e um C terminal não estruturado. Existem muitos tipos de RAGE, com inúmeras

variantes de transcrição e propriedades de ligação ao ligante diferenciada e diversas funções biológicas, por causa das variadas alternativas de *splicing* e clivagem ocasionada pelas metaloproteases, assim como polimorfismos. As isoformas de RAGE incluem RAGE de comprimento total, RAGE negativo dominante (DN-RAGE), RAGE N-truncado (N-RAGE) e secreção truncada em C / RAGE solúvel (sRAGE). O RAGE de comprimento total contém todos os elementos e é a forma ativa da transdução de sinal intracelular, age como mediador principal nas mais variadas cascatas de sinalização a jusante que interferem na resposta inflamatória, nos níveis de estresse oxidativo, migração e proliferação celular e apoptose, efeitos estes gerenciados por mecanismos de feedback positivo. DN-RAGE não apresenta o domínio citoplasmático, o que leva a uma atenuação na transdução de sinal. N-RAGE não apresenta domínio V N-terminal, portanto sua ativação ocorre por mecanismo independente de domínio V. s-RAGE é a forma solúvel circulante de RAGE e não apresenta domínio transmembranar e nem citoplasmático. Devido ao fato de RAGE apresentar vários domínios e várias isoformas, isto o torna capaz de se ligar nas mais variadas moléculas de DAMPs, desencadeando a resposta inflamatória (BONGARZONE et al., 2017).

### 2.3 Inflamossoma

Os PRRs ativados por DAMPs iniciam suas reações em cadeia e montam várias respostas com liberação de citocinas pró-inflamatórias. Dentre os PRRs, os receptores NOD-NLRs e os receptores AIM2, podem reconhecer os DAMPs e formar os inflamossomas, que são plataformas com várias proteínas, construídas no citosol. Estes inflamossomas são inúmeros e eles são classificados de acordo com a proteína que lhes deram origem, como por exemplo, os NLRs que formam a maioria dos inflamossomas e proteínas AIM2 e gene 1 induzível pelo ácido retinóico (RIG-1) (GAO et al., 2017; SHIN et al., 2015).

Os NLRs são constituídos por domínios contendo três partes que são LRRs, que se comunica com ligantes putativos, permeando a autorregulação das proteínas; os NOD (ou NACHT), que normalmente são marginados no domínio N-terminal, por PYD ou CARD. Esses NLRs unem-se a ribonucleotídeos e articulam a auto-oligomerização e produção do inflamossoma; e, pressupõe-se que o domínio N-terminal exerça função nas relações homotípicas proteína-proteína, nas cascatas de sinalização. Quando os NLRs captam estímulos específicos, eles podem oligomerizar e convocar o zimógeno procaspase-1 inativo, que então será clivado, formando caspase-1 ativa. A caspase-1 ativa que é uma protease



dependente de cisteína, pode estimular a maturação de citocinas pró-inflamatórias, através da clivagem da pró-IL-1 $\beta$  e pro-IL18, que dão origem à IL-1 $\beta$  e IL-18, presentes na resposta imune inata e adquirida. Os PAMPs e DAMPs são responsáveis pela indução da transcrição, tradução e liberação de proteínas inflamatórias (FLESHNER, 2013; GAO et al., 2017).

O inflamossoma é composto pela ligação de um NLR, um adaptador ASC e uma caspase-1 ativa, que se torna ativo após a expressão de todos os seus membros; e essa ativação depende de dois sinais. O sinal 1 ocorre através de outros tipos de PRRs como os TLRs, que identificam o ligante e iniciam a transcrição dos genes de IL-1 $\beta$  e IL-18. A necessidade de outro tipo de receptor pode ser uma medida protetiva contra a produção exagerada de IL-1 $\beta$ , que pode desencadear doenças como Vitiligo, Gota e Crohn. O sinal 2 se dá pela ativação de NLR, a proteína adaptadora se conecta ao respectivo domínio de reconhecimento e ocorre a ligação da procaspase-1 via CARD. Enquanto ocorre a ativação, a porção PYD da molécula adaptadora une-se à porção PYD de NLRP3, e sua porção CARD torna-se livre, permitindo então a ligação da procaspase-1, formando o inflamossomo. Ocorre ativação de procaspase-1, que promove a conversão dos precursores de IL-1 $\beta$  e IL-18 em moléculas biodisponíveis. Mas, se o NLR a formar o inflamossomo for NLRC4, que possui domínio efetor CARD, a procaspase-1 se liga diretamente neste domínio, não necessitando da proteína ASC (DIAS; MACTAVISCH; CRUZ, 2015).

De todos os inflamossomas, o que está bem caracterizado e envolvido na inflamação estéril é o NLR que contém 3 domínios de pirina (NLRP3), e está envolvido em várias patologias, como as patologias neurodegenerativas, aterosclerose, diabetes, lesões cardíacas e cerebrais (GAO et al., 2017).

### **2.3.1 NLRP3**

O inflamossoma NLRP3 é o mais bem estudado por que está relacionado a várias doenças sistêmicas como diabetes, câncer, distúrbios cardiovasculares, depressão, ansiedade, doenças neurodegenerativas dentre outras. Ele é ativado após sua ligação ao receptor NLRP3 e promove a ativação da caspase-1 e conseqüentemente, a produção e liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 (IWATA et al., 2016; VANAJA; RATHINAM; FITZGERALD, 2015).

Este inflamossoma desempenha um importante papel na expansão da resposta inflamatória estéril, porém seus mecanismos exatos ainda não foram bem elucidados devido a grande variedade de substâncias que contribuem para sua formação. Estes mecanismos

envolvem efluxo de potássio ( $K^+$ ), geração de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (ROS), translocação de NLRP3 para as mitocôndrias, liberação de DNA mitocondrial, cardiolipina ou liberação de catepsinas para o citosol após desestruturação lisossômica e aumento de cálcio intracelular (GAO et al., 2017; GUO; CALLAWAY; TING, 2015; VANAJA; RATHINAM; FITZGERALD, 2015).

O mecanismo de diminuição de  $K^+$  celular ( $< 90nM$ ) pode ocorrer através de canais iônicos endógenos e pelo receptor purinérgico P2X7 (receptor ionotrópico) e, como estes canais regulam as concentrações de  $H^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^+$ , deduz-se que o fluxo dos demais íons ativa o inflamossoma NLRP3. O mecanismo envolvendo geração de ROS em macrófagos e monócitos, dá-se através de ativadores como o trifosfato de adenosina (ATP) e ácido úrico, dentre outras substâncias, e acredita-se que há uma interligação com a proteína que interage com a tioderóxina (TXNIP) para ativar este inflamossoma. Outro mecanismo ativador de inflamossoma NLRP3 é a liberação de catepsinas no citoplasma celular após rompimento da membrana lisossômica. Estes três mecanismos inter-relacionados estão associados à formação de DNA mitocondrial oxidado que atua como DAMPs quando liberado no citosol (DIAS; MACTAVISCH; CRUZ, 2015; GAO et al., 2017; IWATA et al., 2016).

### 2.3.2 AIM2

É outra classe de inflamossoma que induz ativação da caspase-1 e maturação de  $IL-1\beta$ . Após ligação ao receptor, AIM2 se incorpora à pró-caspase-1 através do seu domínio HIN-200 de ligação ao DNA, que por sua vez se liga ao dsDNA citosólico e ao domínio de pirina. Sua conformação autoinibitória é formada pela interação de seus domínios e é quebrada pelo fosfato de açúcar de dsDNA. O DNA remove o domínio PYD para atrair a proteína adaptadora ASC. Porém, o AIM2 se mantém inativo até que ocorra a ligação de seu ligante. Então, a porção CARD de carboxi terminal de ASC se liga ao CARD da pró-caspase-1, ativando a pró-caspase, formando o inflamossoma AIM2. A Caspase-1 ativada libera a clivagem dos precursores de citocinas pro- $IL-1\beta$  e pró- $IL-18$ . A  $IL-1\beta$  e  $IL-18$ , que tem ação inflamatória e o inflamossoma AIM2 promovem a piroptose que é uma forma lítica de morte celular programada. O inflamossoma AIM2 não reconhece uma sequência específica de dsDNA, e sim necessita de uma cadeia de dsDNA com, no mínimo 80 pares de base para desencadear a piroptose. Os mecanismos de indução e função de AIM2 em leucócitos ainda não foram elucidados (GUO; CALLAWAY; TING, 2015; SVENSSON et al., 2017).

## 2.4. Substâncias que são reconhecidas como DAMPs

### 2.4.1 Proteínas S100

O primeiro membro das proteínas S100 foi encontrado em tecido nervoso, em 1965. Esta família de proteínas recebeu este nome devido à sua propriedade de se tornar solúvel em sulfato de amônio saturado. Apresentam mais de 25 membros, e são expressos e distribuídos em vários tecidos e células humanas de acordo com a especificidade tecidual. Cada proteína é codificada por um gene separado e varia desde o S100A1 a S100A16, S100B, S100G, S100P, S100Z, por exemplo. A maior parte desses genes situa-se no cromossomo 1q21, a S100A11P se localiza no cromossomo 7q22-q3, S100B no cromossomo 21q22, S100P no cromossomo 4p16, S100G no cromossomo Xp22, S100Z no cromossomo 5q13. Estas proteínas apresentam de 22 a 57% de homologia em suas seqüências e estruturas 3D semelhantes, mas, cada membro da família apresenta características únicas (FEI et al., 2017a; RAFFAT et al., 2018; YANG et al., 2018).

As proteínas S100 são ligantes de RAGE, TLR4 via MyD88 e NLRP3. Essas proteínas estão relacionadas a vários tipos de câncer, obesidade, diabetes, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas como Alzheimer, doenças pulmonares, dentre outras (AHMAD et al., 2018; SRIKRISHNA; FREEZE, 2009; TURNER, 2016; VAN LINTHOUT; TSCHÖPE, 2017).

A secreção dessas proteínas pode ocorrer de forma autócrina, endócrina e parácrina, podendo levar a uma alta concentração da mesma, o que pode interferir na sinalização celular nos mais variados tipos celulares (KHAN et al., 2018).

De acordo com a função que exercem, as proteínas S100 dividem-se em 3 subgrupos que são as proteínas S100 que exercem apenas funções intracelulares, com o S100A1 presente no músculo estriado, principalmente o cardíaco, exercendo efeito regulatório do cálcio; proteínas S100 com função intracelular e extracelular, como a S100B que intracelularmente interage com a proteína quinase bloqueando substratos para a proteína NDR quinase e extracelularmente, ativa a proteína quinase que é regulada por sinal extracelular e por NF- $\kappa$ B em condrócitos através da ligação no RAGE; e proteínas S100 com função extracelular, como a S100A15. Dentre as funções destas proteínas, estão a fosforilação de proteínas, homeostasia do cálcio, metabolismo energético, crescimento celular, sinalização intracelular, motilidade, regulação do ciclo celular, enzimas reguladoras, ácidos nucleicos e reparo de DNA,

transcrição, diferenciação, apoptose e sobrevivência das células (FEI et al., 2017b; YANG et al., 2018).

O grupo de proteínas S100, pertencente à família calgranulina que é uma família de ligação ao cálcio, são caracterizadas por motivos de mão EF de ligação de cálcio. Apresentam capacidade de formar homodímeros, heterodímeros e oligômeros. Apresentam 2 domínios distintos de ligação ao cálcio; que possuem conformação tipo helix-loop-helix-mão EF interligados por uma região de dobradiça, a região C-terminal, comum a todas as proteínas e a região N-terminal exclusiva das proteínas S100. Esta região de dobradiça é a responsável pela homologia das seqüências. Sua atividade é regulada por íons metálicos, tais como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , que modulam a moldagem e oligomerização proteica. Essas proteínas não apresentam sinais secretórios que são necessários para o clássico transporte dependente de Golgi, e sim, sua liberação se dá por mecanismos que depende de energia e túbulos que necessitam da ativação de proteína C quinase. Quando estas substâncias são lançadas no meio extracelular devido ao dano celular, elas se tornam DAMPs, que ativarão a resposta imunológica (AHMAD et al., 2018; FEI et al., 2017b; RAFFAT et al., 2018; SRIKRISHNA; FREEZE, 2009; TURNER, 2016; YANG et al., 2018).

Após a lesão celular ou ativação fagocitária, como neutrófilos e macrófagos, as proteínas S100 são liberadas e se ligam aos TLRs e RAGE e desencadeiam a resposta inflamatória através da sinalização em cascata. Quando ligadas ao RAGE, elas ativam NF- $\kappa$ B e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, ocasionando o recrutamento de monócitos, macrófagos e neutrófilos. As proteínas S100, como a S100P, por exemplo, também podem induzir a sinalização da resposta imune via p38 MAPK (YANG et al., 2018).

As proteínas S100B são bem conhecidas e exercem função extracelular em vários tipos celulares como adipócitos, melanócitos, condrócitos, musculatura lisa arterial, células de Schwann, micróglia e astrócitos. No músculo liso vascular, induz ROS e ativa vias JAK 2 e STAT 3, levando à proliferação destas células. Nas células neurais, ela ativa a via Ras-MEK-ERK1/2-NF- $\kappa$ B, que ativa por sua vez, GTPases, promovendo neurites. Sua ligação a RAGE ativa a via fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato de 3-quinase-AKT, causando proliferação celular. Após sua liberação em cardiomiócitos que passaram por infarto do miocárdio, causam apoptose e consequente liberação de ROS. A expressão exagerada de S100B causa influência nos depósitos de amilóides não fibrilar na doença de Alzheimer, dentre outras condições patológicas (KHAN et al., 2018; YANG et al., 2018).

As proteínas S100 expressas predominantemente em células de origem mielóide como a S100A8, S100A9 e S100A12 são as que têm seus efeitos extracelulares mais bem estudados assim como a S100B. As proteínas S100A8 e S100A9 estão presentes em neutrófilos, monócitos, progenitores mielóides e células dendríticas. S100A12 está presente em neutrófilos, macrófagos e monócitos, podendo ser detectado em células endoteliais. A *down* regulação da expressão destas proteínas é realizada durante a diferenciação de macrófagos e células dendríticas. A proteína S100A1, por exemplo, também apresenta efeitos extracelulares deletérios e é uma proteína muito encontrada em cardiomiócitos e sua liberação ocorre após lesão isquêmica, causando efeitos antifibróticos como redução da síntese de matriz extracelular, aumento da degradação desta mesma matriz e diminuição da diferenciação de miofibroblastos. Acredita-se que a formação multimérica das proteínas S100 seja de suma importância para suas funções extracelulares. Dentre os conjuntos multiméricos relatados, estão S100A12, S100A4 e S100B. S100A8 e S100A9 agem como heterodímeros S100A8/A9 (AHMAD et al., 2018; SRIKRISHNA; FREEZE, 2009; TURNER, 2016; VAN LINTHOUT; TSCHÖPE, 2017).

As proteínas S100A4 são expressas em macrófagos, neutrófilos, linfócitos T. Se ligam tanto a RAGE como ao TLR4, mas também pode se ligar a outros receptores como fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o receptor de IL-10. Está associado a várias patologias como fibrose tecidual, artrite reumatóide, psoríase, dano cerebral, doenças pulmonares como a DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) e PAH (Hipertensão Arterial Pulmonar), doenças autoimunes, mas, seu destaque se dá nas doenças cancerígenas. É uma proteína intimamente relacionada às metástases, favorece a angiogênese e é conhecida também como pEL-98, 18A2, p9Ka, CAPL, calvasculina e proteína específica de fibroblastos e, devido a este fato, é um importante biomarcador, pois está associada a um mau prognóstico e sobrevida em pacientes oncológicos (BELTER; HAASE-KOHN; PIETZSCH, 2017; FEI et al., 2017b).

A proteínas S100A8 e S100A9 são relatadas como sendo semelhantes à citocinas e fatores transcricionais, interferindo na expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 e metaloproteinases de matriz (RAFFAT et al., 2018).

O dímero formado S100A8/A9 promove a transmigração de monócitos e neutrófilos, apoptose celular através da formação de ROS, autofagia em linfócitos, macrófagos, células endoteliais e células tumorais e formam a calpronectina (XIA et al., 2018).

A calpronectina é uma proteína de ligação ao cálcio e ao zinco e que recebe várias nomenclaturas como MRP8/14, L1, antígeno 27E10 ou antígeno de fibrose cística. É um

mediador pró-inflamatório que pode ser liberado por queratinócitos que sofreram exposição aos raios UV e está associada ao melanoma e metástases. É considerada um agonista endógeno de ligação ao TLR4 e RAGE. Através de caminhos de sinalização via NF- $\kappa$ B e p38 MAPK, a calpronectina auxilia a produção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos e macrófagos e está também envolvida em vários distúrbios como Doença Celíaca, Doença de Chron, Fibrose Intestinal Cística, Doença de Kawasaki, Artrite Idiopática Juvenil, e várias outras (BELTER; HAASE-KOHN; PIETZSCH, 2017; VAOS et al., 2013; XIA et al., 2018).

#### 2.4.2 Proteínas de Choque Térmico (HSP)

As proteínas de choque térmico (HSPs) são uma família multigênica que originam proteínas muito conservadas e que apresentam ações diferenciadas e estão envolvidas no reparo celular e nos mecanismos de proteção das células contra os diversos tipos de estresse. Essas moléculas intermedeiam o enovelamento ou dobramento de outras proteínas, ou seja, atuam como chaperonas moleculares, garantindo que essas proteínas não mudem suas conformações nativas submetidas a condições estressantes; ligando-se a polipeptídeos nascentes intermediários parcialmente enovelados, prevenindo sua agregação e *misfolding*, e, esse dobramento ou desdobramento de proteínas está associado a várias patologias humanas. Elas são proteínas intracelulares e sua expressão é constitutivamente contida em condições homeostáticas ou proteostáticas. Em condições de estresse fisiológico, sua expressão gênica é aumentada e essas proteínas são liberadas para o meio extracelular (PAUL; MAHANTA, 2014; PENNISI; ASCENZI; DI MASI, 2015; TOLLE; STANDIFORD, 2013; TURNER, 2016).

As HSPs normalmente identificam e se acoplam aos resíduos hidrofóbicos das proteínas não nativas, por ligação não covalente. Essas proteínas HSP são fundamentais para que o fluxo de outras proteínas alcancem as organelas e favorecem o transporte de proteínas para o proteossoma para que ocorra a degradação proteica. As HSPs de mamíferos são alocadas em famílias baseado no peso molecular (PM) de cada proteína, como a HSP27, HSP40, PHSP60, HSP70, HSP90, HSP100. As HSPs com  $PM \geq 34$  KDa são consideradas Small HSPs (seus homólogos são Hsplo, PPlase, PDIase, Cpn20); a HSP40 possui PM variando de 35-54 KDa (homólogos HDJ-1 (MAS5), HDJ-2 (HSDJ) Sislp, Ydjlpg); HSP60 possui PM entre 55-64 (homólogos CCT (complexo TRiC, TCP-1), Hsp60 (Cpn60) RBP); HSP70 com PM entre 65-80 KDa (homólogos Hsp70 (Hsp72) Hsc70 (Hsp73)); HSP90

comPM entre 81-99 KDa (homólogos Hsp82, Hsp83, Hsp90a e Hsp9013, Grp94, GRP94, rp94, endoplasmína, gp96) e HSP100 com  $PM \geq 100$  (Hspl01, Hspl02, Hspl04, Hspl05ct e 13 e Hsp110) (PAUL; MAHANTA, 2014).

A HSP90 é uma proteína diferenciada das demais por não ser imprescindível para a dobragem de novas proteínas, mas sim propiciar a maturação final de proteínas específicas que são chamadas de “clientes”. A maior parte dos clientes HSP90 deve ser enovelada corretamente para que ocorra a interação perfeita com seus ligantes. Portanto, o papel desempenhado pela HSP90 é orquestrar a ordem espacial e temporal das interações proteicas. E para que ocorra a montagem adequada de tais proteínas, a HSP90 interage com seus clientes por intermédio de co-chaperonas de adaptador, como a Cdc37, que auxilia a regulação do ciclo celular e a p23 que atua nos processos de reparação do DNA, além de estabilizar os intermediários de enovelamentos específicos e regular a degradação proteossômica através da ubiquitina (PENNISI; ASCENZI; DI MASI, 2015).

Vários HSPs podem atuar como DAMPs quando liberados para o meio extracelular e estão relacionados à isquemia, doenças neurodegenerativas e câncer. Elas desencadeiam a inflamação, por ativarem citocinas pró-inflamatórias via receptores TLR2 e TLR4, podendo estes receptores atuar juntos ou não, como por exemplo, HSP60, HSP70, HSP90. A HSP70 e seus homólogos estimulam a liberação de citocinas inflamatórias como a IL-8 em monócitos e macrófagos, via MDy88, NFκB, através de TLR2 e TLR4. A gp96, que é uma HSP90, intermedeia a ativação de NFκB, via TLR2-TLR4, de células dendríticas. HSP60 e HSP90 estão envolvidas em neoplasias sendo que a HSP60 atua via TLR4 (TOLLE; STANDIFORD, 2013).

As funções imprescindíveis das HSPs são alteradas nos processos oncogênicos e o aumento da expressão de uma ou mais HSPs é uma característica marcante em neoplasias. O aumento das atividades destas proteínas, a nível molecular, permite que as células neoplásicas se adequem à sinalização desajustada relacionada à modificação neoplásica, inibindo então que estas células tumorais sofram apoptose. Isto faz com que as células neoplásicas se tornem resistentes à resposta imunológica do hospedeiro, e também à quimioterapia e à radioterapia pela sua capacidade de reparo ao DNA. O HSPA90 é expresso cerca de 2 a 10 vezes mais em células cancerosas comparado às células normais, e este fato faz com que ele se torne um poderoso alvo na terapia do câncer, pois seu bloqueio leva à degradação dos seus clientes e estimula a morte tumoral através das células natural killer (NK) melhoradas (PENNISI; ASCENZI; DI MASI, 2015).

### 2.4.3 Grupo Box de Alta Mobilidade 1 (HMGB-1)

O Grupo Box de Alta Mobilidade 1 (HMGB1) é um fator de transcrição estrutural, com PM=30 kDa e que apresenta 3 domínios: são 2 caixas (A e B) com carga positiva que se ligam ao DNA e uma cauda ácida C-terminal, composta pelos ácidos aspártico e glutâmico. As caixas A e B apresentam pontos presumíveis de emigração celular, ao passo que a cauda desempenha papel protetor a essas caixas. É uma proteína altamente conservada e muito expressa em eucariotos. O HMGB1 desempenha 2 tarefas muito importantes e, estas tarefas dependem de sua localização na célula. No núcleo, o papel desempenhado é de proteína de ligação ao DNA para dar sustentação estrutural ao nucleossomo, e como fator transcricional para reger a expressão gênica. Ele apresenta duas sequências de localização nuclear (NLS), as quais são identificadas pelos complexos de importação nuclear para impedir a reintrodução do citoplasma, em situações normais. HMGB1 se une ao sulco sem que haja especificidade da sequência, o que auxilia a estrutura da cromatina e expressão gênica, sendo este papel essencial para a homeostase celular. Sua translocação no citoplasma pode ser guiada pós-traducionais, como metilação, acetilação e fosforilação, como por exemplo, sua hiperacetilação em sua localização no núcleo de macrófagos e monócitos, o que o leva a ser realocado no citoplasma. No citoplasma, ele é condensado em lipossomas secretores e é secretado quando as células imunes recebem sinal adequado para tal (FENG; TU; YIN, 2016; ZHANG et al., 2017).

Quando o HMGB1 é liberado para o meio extracelular, após se desligar da cromatina, ele desencadeia várias respostas inflamatórias, com atividades quimiotáticas e de ativação de células apresentadoras de antígenos (APC), ativando resposta imune inata e adaptativa. HMGB1 contém 3 cisteínas redox sensíveis bem conservadas (C23, C45 e C106), e a oxidação dessas cisteínas estabelece sua bioatividade extracelular e, conseqüentemente, sua função imune. Primeiro, o HMGB1 é totalmente reduzido, ou seja, sem alterações pós-transcricionais, é a conformação que predomina tanto no núcleo quanto no citoplasma, forma um heterocomplexo com a quimiocina CXCL12, que se liga ao receptor CXCR4 para que ocorra a migração de células, segundo é o dissulfureto HGMB, onde, para que ocorra a estimulação de citocinas, é necessário que C3 e C45 apresentem uma ligação dissulfureto. Então, o dissulfureto HMGB1 pode se acoplar e sinalizar, via complexo TLR4/MD-2 (fator de diferenciação mielóide 2), a liberação de citocinas em macrófagos como a IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Para que ocorra interação HMGB1-TLR4, é necessário que C106 esteja reduzida. Nestas



condições, o HMGB1 atua com fator quimiotático, em níveis basais. A terceira forma que é a sulfonil HMGB1, onde há exposição de HMGB1 a ROS, e ocorre completa oxidação onde cada cisteína é oxidada na forma de sulfonilo sem associação a alguma função biológica (YANG et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

HMGB1 está relacionado a vários distúrbios como periodontite e doenças Peri-implante, obesidade, resistência à insulina o que leva à diabetes 2, e diabetes tipo 1 por induzir a morte das células  $\beta$  mediada via ROS, por intermédio de NADPH oxidase, hepatopatias, câncer, isquemia, convulsão, trauma cerebral, neurodegeneração, cardiopatias, dentre outras, sendo seu papel no câncer o de desenvolver a tumorigênese, auxiliando a angiogênese, a evasão apoptótica, invasão tecidual e metástases (FENG; TU; YIN, 2016; LIU et al., 2017; SHI et al., 2017; SHIN et al., 2015; TAI; WONG; WEN, 2016; YANG et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Para intermediar a resposta inflamatória, o HMGB1 se liga aos seus receptores que são o RAGE e os TLRs 2, 4 e 9. O TLR4 é considerado o receptor chave e, através de sua interação com o HMGB1 extracelular, ocorre a ativação do NF- $\kappa$ B, que promoverá a expressão de onde resulta na liberação de citocinas inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-11 e TNF- $\alpha$  dentre outras como as ciclooxigenase (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no cérebro (FENG; TU; YIN, 2016a; LIU et al., 2017; TAI; WONG; WEN, 2016).

### **3 Bioinformática**

A bioinformática é uma linha de pesquisa de caráter multidisciplinar que utiliza ferramentas computacionais para analisar dados genômicos, bioquímicos e moleculares, combinando inovações técnicas e científicas de diversas áreas do conhecimento como a ciência da computação, química, estatística e a biologia molecular. Sua finalidade é analisar a enorme quantidade de dados oriundos dos diversos métodos de sequenciamento de genomas, transcriptomas, proteomas e outros (PROSDOCIMI, 2007b).

A bioinformática surgiu na década de 80, com o intuito de ampliar as fronteiras do conhecimento através da análise e apresentação de dados biológicos de forma matemática, utilizando algoritmos computacionais. Com o advento da tecnologia acessível a um grande número de pessoas e a conscientização dentre os pesquisadores sobre ética em experimentação e bem estar animal, ela vem substituindo, de maneira muito significativa e

contundente, o atual modelo de pesquisa. Esta transformação e progresso de recursos tecnológicos, principalmente na área de Ciências da Saúde, têm sido prioritário para prover certas carências no que tange ao armazenamento e comparação de dados genômicos de natureza humana (ARAÚJO et al., 2008).

Com a grande geração de informações biomédicas ao longo dos anos, como informações do genoma, transcriptoma e/ou proteoma, tornou-se imprescindível o uso de técnicas computacionais capazes de armazenar e processar tais informações de maneira ágil e eficaz. A bioinformática integra programas computacionais, para analisar dados e identificar sequências genômicas, prever estrutura tridimensional das proteínas, identificar enzimas inibidoras, proporcionar a aglomeração protéica, construir árvores filogenéticas, avaliar a expressão gênica, dentre outras análises (ARAÚJO et al., 2008; CAO et al., 2018; POLAND et al., 2013; SORIA-GUERRA et al., 2015).

Vários estudos relacionados aos agentes tóxicos; epilepsia; e vários tipos de câncer, como melanoma cutâneo, câncer de mama, carcinoma hepático; também utilizam análises computacionais para elucidar os mecanismos envolvidos nestas e outras patologias. As inovações tecnológicas fornecem dados genômicos de forma exponencial e a interpretação destes dados relacionados a várias doenças tem sido extremamente explorada em pesquisas (ABRHA; SUVOROV, 2018; DUNN et al., 2018; KONTOGIANNI et al., 2018; TARRERO et al., 2018; YANG et al., 2018).

Para predição de estrutura secundária do mRNA baseado em predição de energia livre mínima, existem duas ferramentas muito utilizadas que são RNA Structure desenvolvido pelo Departamento de Biochemistry & Biophysics from University of Rochester Medical Center, New York capaz de analisar sequências que apresentam até 4000 pb e, RNA fold WebServer desenvolvido pelo Institute for Theoretical Chemistry from University of Vienna, Áustria, capaz de analisar sequências com até 5000 pb. RNA Structure utiliza combinação de 4 algoritmos para prever estrutura secundária do RNA através do cálculo de uma função de partição que gera a estrutura de energia livre mínima (MFE) onde consegue detectar estruturas com máxima precisão. A análise gera um grupo de estruturas secundárias com alta probabilidade a partir da menor energia livre e outras com diferentes probabilidades de correção (“Welcome to the Predict a Secondary Structure Web Server”, [s.d.]). RNA fold WebServer é baseado no método de Zuker e Stiegler, (1981) cuja energia livre mínima para conformação da molécula é baseada em valores de energia de empilhamento e

desestabilização, baseado em algoritmos de programação dinâmica (ZUKER; STIEGLER, 1981), (“Servidor web RNAfold”, [s.d.]).

O Immune Epitope Database Analysis Resource é um banco de dados experimentais catalogados sobre epítomos de células B e células T estudados em todas as espécies no que concerne a todas as doenças e apresenta várias ferramentas para auxiliar na predição e análise de epítomos, utilizando vários tipos de escala (“IEDB.org: Banco de dados de epítomo gratuito e recurso de previsão”, [s.d.]).

As análises de similaridade podem ser realizadas através do BLAST- *Basic Local Alignment Search Tool*, que é capaz de encontrar regiões de similaridade local entre sequências nucleotídicas ou proteicas que são comparadas com outras sequências de nucleotídeos ou proteínas, onde a significância estatística das correspondências é calculada. O BLAST pode inferir relações de funcionalidade e evolução entre as sequências e auxiliar na identificação dos membros familiares dos genes (“BLAST: Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local”, [s.d.]).

O Primer-BLAST é uma das ferramentas públicas computacionais mais utilizadas para desenhar *primers* específicos para o alvo. É uma ferramenta flexível que incorpora o BLAST e é altamente sensível no reconhecimento de proteínas alvos de amplificação (YE et al., 2012).

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os DAMPs desencadeiam resposta inflamatória estéril por ativarem a resposta imune inata quando ligados aos seus receptores. Estes receptores estão presentes na membrana plasmática, membrana endossomal e citoplasma de diversos tipos celulares. Essa resposta inflamatóriaa princípio aguda, é controlada por citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e é capaz de desencadear mecanismos especializados de defesa pela ativação de várias cascatas de sinalização. Caso essa resposta ocorra de forma exacerbada, sua evolução pode associar-se a várias complicações que promoverão o desenvolvimento de enfermidades no ser humano, como câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, dentre inúmeras outras doenças. Isso acarretará na perda de funcionalidade do órgão acometido, culminando numa má qualidade de vida e até mesmo no óbito. A Bioinformática é uma ferramenta amplamente utilizada, sendo capaz de fornecer vários dados biológicos relevantes, com grande probabilidade de elucidar os

mecanismos envolvidos nessas diversas patologias. Portanto, o uso dessa ferramenta é capaz de contribuir para o tratamento e avaliação prognóstica.

## 5 REFERÊNCIAS

ABRHA, A.; SUVOROV, A. Transcriptomic Analysis of Gonadal Adipose Tissue in Male Mice Exposed Perinatally to 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl Ether (BDE-47). **Toxics**, v. 6, n. 2, p. 21, mar. 2018.

AHMAD, S. et al. AGEs, RAGEs and s-RAGE; friend or foe for cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 49, p. 44–55, abr. 2018.

ARAÚJO, N. D. DE et al. a Era Da Bioinformática : Seu Potencial E Suas Implicações Para As Ciências Da Saúde. **Champagnat**, v. 30, p. 143–148, 2008.

BELTER, B.; HAASE-KOHN, C.; PIETZSCH, J. **Biomarkers in Malignant Melanoma: Recent Trends and Critical Perspective**. [s.l.] Codon Publications, 2017.

**BLAST: Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local**. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

BONGARZONE, S. et al. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 17, p. 7213–7232, set. 2017.

CAO, C. et al. Deep Learning and Its Applications in Biomedicine. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 17–32, fev. 2018.

DIAS, G. P.; MACTAVISCH, F.; CRUZ, D. INFLAMASSOMOS Estruturas, mecanismos de ativação e importância na resposta imunológica. **Episteme Transversales**, 2015.

DUNN, P. et al. Next Generation Sequencing Methods for Diagnosis of Epilepsy Syndromes. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 20, fev. 2018.

FEI, F. et al. Role of metastasis-induced protein S100A4 in human non-tumor pathophysiology. **Cell & bioscience**, v. 7, p. 64, 2017a.

FEI, F. et al. S100A4 in cancer progression and metastasis: A systematic review. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 73219–73239, set. 2017b.

FENG, A.; TU, Z.; YIN, B. The effect of HMGB1 on the clinicopathological and prognostic features of non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 20507–19, abr. 2016.

FLESHNER, M. Stress-evoked sterile inflammation, danger associated molecular patterns (DAMPs), microbial associated molecular patterns (MAMPs) and the inflammasome. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 27, n. 1, p. 1–7, jan. 2013.

GAO, L. et al. NLRP3 inflammasome: a promising target in ischemic stroke. **Inflammation Research**, v. 66, n. 1, p. 17–24, 2017.

GRISHMAN, E. K.; WHITE, P. C.; SAVANI, R. C. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome, and interleukin-1 $\beta$  in the development and progression of type 1 diabetes. **Pediatric Research**, v. 71, n. 6, p. 626–632, 2012.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease and therapeutics. **Nature Medicine**, v. 21, n. 7, p. 677–687, jul. 2015.

**IEDB.org: Banco de dados de epítipo gratuito e recurso de previsão.** Disponível em: <[http://www.iedb.org/home\\_v3.php](http://www.iedb.org/home_v3.php)>. Acesso em: 13 maio. 2019.

IWATA, M. et al. Psychological Stress Activates the Inflammasome via Release of Adenosine Triphosphate and Stimulation of the Purinergic Type 2X7 Receptor. **Biological Psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 12–22, jul. 2016.

IWATA, M.; OTA, K. T.; DUMAN, R. S. The inflammasome: Pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2013.

KHAN, M. I. et al. S100B as an antagonist to block the interaction between S100A1 and the RAGE V domain. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0190545, fev. 2018.

KONTOGIANNI, G. et al. Dissecting the Mutational Landscape of Cutaneous Melanoma: An Omic Analysis Based on Patients from Greece. **Cancers**, v. 10, n. 4, p. 96, mar. 2018.

KURAMOCHI, M. et al. The kinetics of damage-associated molecular patterns (DAMPs) and toll-like receptors during thioacetamide-induced acute liver injury in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2016.

LIU, J. et al. High Mobility Group Box 1 Protein Level as a Novel Biomarker for the Development of Peri-Implant Disease. [s.d.].

NAKAHIRA, K.; HISATA, S.; CHOI, A. M. K. The Roles of Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns in Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 17, p.

1329–1350, dez. 2015.

PATIDAR, A. et al. DAMP-TLR-cytokine axis dictates the fate of tumor. **Cytokine**, v. 104, p. 114–123, 1 abr. 2018.

PAUL, S.; MAHANTA, S. Association of heat-shock proteins in various neurodegenerative disorders: is it a master key to open the therapeutic door? **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 386, n. 1–2, p. 45–61, jan. 2014.

PENNISI, R.; ASCENZI, P.; DI MASI, A. Hsp90: A New Player in DNA Repair? **Biomolecules**, v. 5, n. 4, p. 2589–2618, out. 2015.

POLAND, G. A. et al. Vaccinomics, adversomics, and the immune response network theory: Individualized vaccinology in the 21st century. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 89–103, abr. 2013.

PROSDOCIMI, F. **CURSO ON LINE INTRODUÇÃO À BIOINFORMÁTICA**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://biotec.icb.ufmg.br/chicopros/Prosdocimi07\\_Curso](http://biotec.icb.ufmg.br/chicopros/Prosdocimi07_Curso)>. Acesso em: 13 maio. 2019b.

RAFFAT, M. A. et al. S100 proteins in oral squamous cell carcinoma. **Clinica Chimica Acta**, v. 480, p. 143–149, maio 2018.

RANI, M. et al. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) released after burn are associated with inflammation and monocyte activation. **Burns**, v. 43, n. 2, p. 297–303, mar. 2017.

**Servidor web RNAfold**. Disponível em: <<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

SHAO, Y. et al. Lysophospholipids and Their Receptors Serve as Conditional DAMPs and DAMP receptors in Tissue Oxidative and Inflammatory Injury Total number of figures and tables: 3 greyscale and 2 color illustrations. **Antioxid Redox Signal**, 2017.

SHI, X. et al. HMGB1 binding heptamer peptide improves survival and ameliorates brain injury in rats after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. **Neuroscience**, v. 360, p. 128–138, set. 2017.

SHIN, J. J. et al. Damage-associated molecular patterns and their pathological relevance in diabetes mellitus. **Ageing Research Reviews**, v. 24, n. Pt A, p. 66–76, nov. 2015.

SORIA-GUERRA, R. E. et al. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 53, p. 405–

414, fev. 2015.

SRIKRISHNA, G.; FREEZE, H. H. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 11, n. 7, p. 615–28, jul. 2009.

SVENSSON, A. et al. Maturation-dependent expression of AIM2 in human B-cells. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0183268, ago. 2017.

TAI, N.; WONG, F. S.; WEN, L. **The role of the innate immune system in destruction of pancreatic beta cells in NOD mice and humans with type I diabetes**. **Journal of Autoimmunity**, 2016.

TARRERO, L. C. et al. Luminal breast cancer-specific circular RNAs uncovered by a novel tool for data analysis. **Oncotarget**, v. 9, n. 18, p. 14580–14596, mar. 2018.

TOLLE, L. B.; STANDIFORD, T. J. Danger-associated molecular patterns (DAMPs) in acute lung injury. **The Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 145–156, jan. 2013.

TURNER, N. A. Inflammatory and fibrotic responses of cardiac fibroblasts to myocardial damage associated molecular patterns (DAMPs). **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 94, p. 189–200, maio 2016.

VAN LINTHOUT, S.; TSCHÖPE, C. Inflammation – Cause or Consequence of Heart Failure or Both? **Current Heart Failure Reports**, v. 14, n. 4, p. 251–265, ago. 2017.

VANAJA, S. K.; RATHINAM, V. A. K.; FITZGERALD, K. A. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 5, p. 308–315, maio 2015.

VAOS, G. et al. The Role of Calprotectin in Pediatric Disease. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

**Welcome to the Predict a Secondary Structure Web Server**. Disponível em: <<https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

XIA, C. et al. S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1908, jan. 2018.

YANG, R. et al. HMGB1 and Extracellular Histones Significantly Contribute to Systemic Inflammation and Multiple Organ Failure in Acute Liver Failure. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–6, 2017.

YANG, X. et al. Clinical significance of microRNA-449a in hepatocellular carcinoma with microarray data mining together with initial bioinformatics analysis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 4, p. 3247–3258, fev. 2018.

YE, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 134, 18 jun. 2012.

ZHANG, J. et al. HMGB1, an innate alarmin, plays a critical role in chronic inflammation of adipose tissue in obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 454, p. 103–111, out. 2017.

ZHU, X. et al. AGER promotes proliferation and migration in cervical cancer. **Bioscience reports**, v. 38, n. 1, 2018.

ZUKER, M.; STIEGLER, P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. **Nucleic acids research**, v. 9, n. 1, p. 133–48, 10 jan. 1981.



**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**SELEÇÃO *in silico* DE PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS AO DANO  
(DAMPs) E SEUS RECEPTORES EM SERES HUMANOS**

**Artigo elaborado de acordo com as normas do periódico Bioanalysis**

## SELEÇÃO *in silico* DE PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS AO DANO (DAMPs) E SEUS RECEPTORES EM SERES HUMANOS

### **Resumo:**

Os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) são moléculas intracelulares que são lançadas para o meio extracelular após lesão celular, e são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) e ativam o sistema imune inato, desencadeando uma resposta inflamatória. Dentre os PRRs, estão o Receptor Toll-like (TLRs), o Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGEs), Receptor Nod-like (NLRs) e Receptor Ausente no Melanoma 2 (AIM-2). Os DAMPs mais comumente estudados são as proteínas S100, as Proteínas de Choque Térmico (HSPs) e o Grupo Box de Alta Mobilidade 1 (HMGB1). Essas moléculas encontram-se intimamente envolvidas na etiopatogenia de doenças crônicas como câncer, diabetes, hepatopatias, cardiopatias; e doenças neurodegenerativas. Nesse contexto, a seleção de marcadores moleculares que viabilizem a montagem de ensaios biológicos, com vistas à elucidação da avaliação da resposta imunológica nessas enfermidades assume grande relevância. Assim, com o auxílio da bioinformática, o presente trabalho avaliou diferentes DAMPs humanos e seus receptores no intuito de encontrar marcadores moleculares associados a enfermidades. Todos os dados foram pesquisados e analisados na plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), onde foi realizada uma triagem de sequências de aminoácidos RNA mensageiro (mRNA) usando a ferramenta nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Foram avaliados a predição de mRNA secundário através dos software RNAstructure e RNA fold WebServer, predição de antigenicidade de epítomos pelo software do Immune Epitope Database Analysis Resource, análise de similaridade através do BLAST e desenho de primers pelo Primer-BLAST. Considerando as melhores predições de mRNA secundário de receptores e DAMPs, foram preditos 104 epítomos e 83 candidatos a marcadores moleculares. Esses resultados são promissores e poderão contribuir para o tratamento e avaliação prognóstica de várias enfermidades.

Palavras-chave: Bioinformática; Sistema imunológico; Imunidade Inata; mRNA, Doenças

## **Introdução:**

A resposta imune inata representa um sistema de menor especificidade de defesa imunológica encontrado em todos os organismos multicelulares [1–3]. As principais células envolvidas nesse processo são os neutrófilos, fagócitos mononucleares, eosinófilos, mastócitos, células natural killer e células dendríticas. A imunidade inata pode ser ativada de forma exógena, por agentes patogênicos através dos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs); e através de moléculas endógenas produzidas ou liberadas de células danificadas, sendo denominados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) [4,5].

Os DAMPs se ligam aos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR), como os Receptores Toll-like (TLRs), presentes na membrana plasmática e endossoma das células apresentadoras de antígeno, o Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGEs), Receptor de Interleucina-1 (IL1R1), os Receptores Nod-like (NLRs), dentre os quais se destaca o Receptor de Domínios de Oligonização e Nucleotídeo (NOD) e o Receptor Semelhante a Melanoma-2 (AIM2). Esse processo inicialmente estimula a síntese e secreção de citocinas pro-inflamatórias [6–8].

Estudos revelam o envolvimento íntimo dos DAMPs à patogênese de doenças crônicas como diabetes, câncer, cardiopatias, hepatopatias, obesidade, doenças neurodegenerativas, doença periodontal, dentre outras. Como exemplos de DAMPs existem as Proteínas S100, Proteínas de Choque Térmico (HSPs), Grupo Box de Alta Mobilidade 1 (HMGB1) [4,6–12].

Tendo em vista a variabilidade de DAMPs e o envolvimento de fatores ambientais estressantes, além dos fatores fisiológicos comuns, como o processo de envelhecimento, na intrincada rede de resposta imunológica, torna-se imprescindível a análise molecular desses componentes, comparando suas estruturas, bem como a relação com diversas doenças, no intuito de estabelecer padrões diagnósticos e/ou terapêuticos.

Com o auxílio da bioinformática, o presente trabalho objetivou investigar diferentes DAMPs humanos e seus receptores com potencial de determinar sequências alvos que poderão ser utilizados para avaliar o prognóstico de enfermidades ou ainda como moduladores na resposta imunológica.

## Material é métodos:

### Sequência utilizadas

Foram realizadas revisão bibliográfica e pesquisa em bancos de dados públicos das principais sequências nucleotídicas de DAMPs e seus receptores, estudados e disponíveis para análises *in silico*. Os DAMPs selecionados foram Proteínas S100, HSP e HMGB-1 e os receptores TLRs, RAGEs, IL1R1, NLRs e AIM-2. Os dados foram pesquisados e analisados na plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Foi realizada uma triagem de sequências de aminoácidos RNA mensageiro (mRNA) dos DAMPs e de seus receptores usando a ferramenta nucleotide do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

### Predição de mRNA Secundário

A predição de mRNA secundário, que prevê a menor energia livre para conformação espacial, foi realizada por meio de softwares online que utilizam algoritmo de energia livre mínima (MFE) usando os softwares online RNAstructure desenvolvido pelo Department of Biochemistry & Biophysics from University of Rochester Medical Center, New York, que consegue analisar sequências que apresentam até 4000 pares de base (pb) [13,14] (<https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>); e RNA fold WebServer desenvolvido pelo Institute for Theoretical Chemistry from University of Vienna, Austria (RNA fold WebServer) que consegue analisar sequências com até 5000 pb para previsões de energia livre mínima (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

### Predição de Antigenicidade de Epítomos

Foi realizada a predição de antigenicidade de epítomos de todas as sequências encontradas, através do Immune Epitope Database Analysis Resource. Nesse trabalho, foi utilizada a ferramenta de Predição de Epítomo de célula B, que prevê regiões de proteínas que podem ser reconhecidas como determinantes antigênicos (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>). A escala de antigenicidade escolhida foi a de Kolaskar e Tongaonkar.

### Análise de similaridade com outros mamíferos

Para a análise de similaridade entre os mamíferos, foi utilizada a ferramenta BLAST (Basic Alignment Search Tool) que se encontra na plataforma NCBI. As análises foram realizadas no

BLASTn que compara sequências de nucleotídeos a bancos de dados de sequências de nucleotídeos e calcula a significância estatística das correspondências (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### Desenho de marcadores

Os *primers* para identificação de biomarcadores foram desenhados a partir das sequências de mRNA que apresentaram a melhor predição de estrutura secundária e o software utilizado foi o Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os parâmetros definidos para o desenho de *primers* foram o tamanho do produto de PCR com mínimo de 90 pares de base (pb) e máximo de 150 pb; o número de até 10 *primers* de retorno para cada sequência; temperatura de melting com mínima de 57,0°C e máxima de 63,0°C e temperatura ótima de 60,0°C; abrangência da junção exon-exon para haver amplificação somente de mRNA; base de dados RNA RefSeq; e permissão de variantes de emenda para análises de receptores e DAMPs que apresentaram variantes. Os demais parâmetros permaneceram com configuração padrão. A temperatura de Melting e temperatura de Anelamento foram validadas pela calculadora TmCalculator da Thermo Fisher Scientific ([www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html](http://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html))

#### **Resultados:**

Após levantamento bibliográfico, foi realizada a triagem de sequências de aminoácidos (mRNA) dos DAMPs e de seus receptores usando a ferramenta nucleotide do NCBI gerando um total de 226 sequências, sendo 9 sequências RAGE, 24 sequências TLRs, 10 sequências IL1R1, 24 sequências NOD-Like, 1 sequência AIM-2, 122 sequências HSP, 4 sequências HMGB1 e 32 sequências S100.

#### Predição de mRNA secundário

Do total de 226 sequências, 161 que possuem até 4000 pb foram submetidas ao software RNAstructure que gera 20 modelos de predição de energia livre para cada sequência, e

destas, foi selecionada a sequência de menor energia livre. As outras 65 sequências, acima de 4000 pb, foram realizadas no RNA fold WebServer. As sequências com a menor energia livre (MFE) para os PRRs e DAMPs estão apresentadas nas Tabelas 1 a 13.

### Predição de Antigenicidade de Epítomos

Todas as 226 sequências foram submetidas à análise de predição de antigenicidade de epítomos e foram selecionadas as sequências que atingiram maior pontuação. As Tabelas 14 a 20 apresentam os resultados da predição de antigenicidade, mostrando a posição do resíduo<sup>1</sup> dentro do peptídeo. Cada resíduo representado por uma letra corresponde a um aminoácido diferente. Dentre as sequências de cada receptor e de cada DAMPs, algumas apresentaram a mesma posição, resíduo, peptídeo e pontuação como todas as variantes para RAGE, TLR2, NLRC5, NOD1, NLRP1, HMGB1, HSP40B6, HSP40C5B, HSP40C12, HSP40C21, HSP40C27, HSP40C28, HSP60, HSP70 membros 8 e 14, HSPB11, as proteínas S100A2, S100A4, S100A13 e S100A16; e as variantes 1 a 5 da HSP HIKESHI, variantes 1 e 2 da HSP40C2, variantes 1 e 2 da HSP40C5G e variantes 1 e 2 da proteína S100A8. As sequências que apresentaram mesmo resíduo, peptídeo e score, variando apenas a posição foram TLR4, TLR8, TLR10, AIM2, NLRC4, NOD2, NLRP3, HSP40A3, HSP40B1, HSP40C6, HSP40C7, HSP7012A, HSP7012B, HSP90AA1, HSP90AB1, e as variantes 1 a 9 do IL1R1, as variantes 1 a 5 da HSP40B4, as variantes 1 e 2 da HSP40B14, as variantes 1, 2, 3 e 5 da HSP110 Membro 1 e as variantes 2, 3, 4, 6, 7 e 8 da HSPB7. As sequências que apresentam diferenças no resíduo, peptídeo e score dentro de cada grupo de PRR e DAMPs são as proteínas HSP40A1, HSP40B2, HSP40C16, HSP40C19, HSP704LIKE, a variante 10 da IL1R1, variantes 6 e 7 da HSP HIKESHI, as variantes 4 e 6 da HSP40B4, a variante 3 da HSP40C2, a variante 3 da HSP40C5G, as variantes 1 e 5 da HSPB7 e a variante 3 da proteína S100A8. A HSP40B14 variante 3 apresenta mesmo resíduo e diferente peptídeo e score das demais variantes do seu grupo.

### Análise de similaridade

Os resultados da análise de similaridade entre as sequências humanas e sequências de outros mamíferos revelou que algumas sequências de nucleotídeos são exclusivas para o *Homo*

---

<sup>1</sup>Resíduo: A (Alanina), C (Cisteína), D (Ácido aspártico), E (Ácido glutâmico), F (Fenilalanina), G (Glicina), H (Histidina), I (Isoleucina), K (Lisina), L (Leucina), M (Metionina), N (Asparagina), P (Prolina), Q (Glutamina), R (Arginina), S (Serina), T (Treonina), V (Valina), W (Triptofano), Y (Tirosina).

*sapiens*. Dentre os PRRs, as sequências que são exclusivas em humanos são a variante 3 de RAGE; o TLR 1, as variantes 1 a 6 do TLR2, as variantes 1,3 e 4 do TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, AIM2, variante 1 NLRC3, NLRC4, NLRC5 e NOD1. A exclusividade de sequências dentre os DAMPs são HSP40A3, HSP40B1, variantes 1 e 3 da HSP40C6, variantes 1 e 3 da HSP40C21, HSP704LIKE, HSP7012A, HSP7012B, HSPB3, HSPB7, HSPB9, proteínas S100A2, S100A3, variante 1 da S100A4, S100A5, S100A7, S100A7A, S100A12, S100A13, as variantes 1 e 2 da S100A16, S100P e S100Z. As espécies que apresentaram maior similaridade com o *Homo sapiens* foram primatas, bovinos, equinos, suínos, camundongos, cães, coelhos, esquilos e panda gigante.

#### Desenho de iniciadores (*Primers*)

Considerando as sequências com os melhores resultados das análises anteriores, foram desenhados *primers* para amplificação de candidatos a marcadores moleculares, sendo 20 pares de *primers* para os receptores e 74 pares de *primers* para DAMPs, conforme apresentados nas Tabelas 21 a 24. Para o receptor TLR6 e para os DAMPs HSP40C30, HSP70 1A, HSP70 1B, HSP70 2, HSP70 6, HSPB3 e HSPB9 os *primers* não foram desenhados, pois não atenderam ao parâmetro metodológico abrangência da junção exon/exon estabelecido para esta pesquisa. Os *primers* desenhados para as sequências de HSP40C9 e HSP70 8 não atenderam ao requisito composição GC pré-estabelecido na metodologia, apresentando conteúdo acima de 70%.

#### Validação

A validação de *primers* fornece o conteúdo GC da sequência forward e reverse, a temperatura de melting e a temperatura de anelamento como apresentado nas Tabelas 25 a 28. As Temperaturas de melting do TLR10, das HSP40A2, HSP40B4, HSP40C7, HSPB1, HSPB2, S100A1, S100A3, S100A16 e S100P ultrapassam o limite máximo pré-estabelecido na metodologia, e a HSP40C9 apresenta conteúdo GC acima de 70%. Todos os outros *primers* foram validados pela calculadora TmCalculator da Thermo Fisher Scientific.

## Discussão

A avaliação dos DAMPs e seus receptores, sob aspecto molecular permite a seleção de marcadores que possam viabilizar a montagem de ensaios biológicos. Foram determinadas sequências de DAMPs e seus receptores, que poderão, no futuro, serem testadas em ensaios no prognóstico de enfermidades ou moduladores da resposta imunológica. Entende-se por marcador molecular como sendo “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica”[15]. A viabilidade do uso de marcadores moleculares está na capacidade do diagnóstico, tratamento e prognóstico de doenças sem a necessidade de invadir o tecido doente, usando apenas sangue ou urina, por exemplo [16].

Foi realizado uma predição de mRNA para verificar a estabilidade proteica das sequências baseado na energia livre. A análise de energia livre mínima (MFE) revelou a menor energia para cada sequência mRNA. Isto pressupõe que a estrutura conformacional da molécula terá uma proteína prevista estável [14,17,18].

O desenho dos *primers*, apresentados nas Tabelas 21 a 24, foi realizado considerando as sequências que apresentaram melhor predição de estrutura secundária por conferir maior estabilidade à proteína. Os *primers* típicos devem ter de 16 a 28 nucleotídeos de comprimento [19], apresentar composição GC de 30% a 70% e composição ótima de 50% [20], ter uma distribuição equilibrada dos domínios G/C e A/T e podem apresentar homopolímeros (sequência de bases idênticas consecutivas) de até 6 bases contínuas [21]. Esses *primers*, desenhados em cima da sequência do transcrito primário, por meio da qPCR, poderão ser utilizados em ensaios quantitativos, pois é sabido que a expressão dos mesmos está intimamente ligada ao diagnóstico, tratamento e prognóstico de enfermidades [5,8,12,22–49]. Os *primers* foram validados pela calculadora TmCalculator da Thermo Fisher Scientific e o conteúdo GC, temperatura de melting e temperatura de anelamento estão apresentados nas Tabelas 25 a 28.

A ativação irrestrita de TLRs pode desencadear respostas inflamatórias severas ocasionando diversos distúrbios patológicos como doenças autoimunes e neurodegenerativas [42], dentre outras como asma, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, diabetes tipo 1 [44], mas também podem ser indicativos de proteção em alguns casos de câncer de pulmão, quando, por exemplo, o TLR4 é altamente expresso nesse tecido; bem como outros TLRs em câncer de pulmão, mama, próstata e estômago já relatados em humanos e modelos murinos, levando ao entendimento de que os TLRs podem servir como biomarcadores em potencial



[50]. De acordo com este estudo, o marcador TLR 4 em potencial (primer forward ATGCCAGGATGATGTCTGCC e primer reverse GGATTTACACCTCCACGCA) poderá avaliar o prognóstico em alguns casos de câncer de pulmão, onde se sabe que sua expressão elevada é um fator de proteção. Em doenças autoimunes e algumas doenças neurodegenerativas como Alzheimer, os pares de iniciadores do TLR4, indicariam um agravamento da doença em caso de aumento em seu nível de expressão. Em distúrbios neurológicos, o papel modulador dos TLRs têm merecido destaque como no AVC, onde o TLR2 e TLR4 induzem reações pró-inflamatórias, agravando a lesão tecidual [45]. O marcador TLR2 primer forward AGGTGACTGCTCGGAGTT e primer reverse TCCAGTGCTTCAACCTTCAC, juntamente com o marcador TLR4 do presente estudo será útil para avaliar a gravidade da lesão, onde o aumento da sua expressão confere prognóstico desfavorável pela ativação de cascatas de sinalização pró-inflamatórias. Os TLRs quando estimulados por diversos ligantes incluindo o HMGB1, as HSPs e proteínas S100, ativam vias de sinalização que promovem a ativação de NF- $\kappa$ B, MAPK e JNK [51] que vão desencadear a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias [44].

RAGE é um membro da superfamília de imunoglobulinas (Ig) e apresenta uma cauda curta no citossol, domínio único transmembranar e três domínios extracelulares, sendo uma variável (V) e duas constantes (C1 e C2), sendo o domínio variável onde ocorre a maioria das ligações e são importantes biomarcadores por se ligarem a uma grande variedade de DAMPs e promover resposta imunológica [22]. Este receptor, com exceção do tecido pulmonar, apresenta baixa expressão ou expressão negativa em tecidos não lesionados, aumentando consideravelmente em processos inflamatórios [46], apresentando distribuição ampla pelos tecidos, mas é mais expressivo em tecidos vasculares e neurais [47]. As células do endotélio expressam isoformas transmembranares desse receptor como FullLength (FL-RAGE) que é a forma mais expressa em tecido pulmonar, N-truncated (Nt-RAGE) cuja forma não apresenta o domínio variável (V), a forma secretora endógena (esRAGE) formada pelos domínios constantes (C1 e C2) e o domínio variável (V) e RAGE solúvel (sRAGE) que pode ser decorrente de um splicing ou formado pela proteólise de FL-RAGE e pode ter atuação impeditiva no acoplamento dos ligantes RAGE, como o HMGB1 e proteínas S100, inibindo a ativação celular mediada por este receptor [48]. O complexo ligante-RAGE estimula uma série de vias inflamatórias que acarretam na formação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e TNF [8,49]. A transdução de sinal leva à inflamação, proliferação celular, migração e crescimento tumoral, acarretando em várias patologias como câncer, aterosclerose, diabetes,

neurodegeneração e inflamação vascular crônica [5,22]. RAGE também é encontrado nas células da micróglia e está relacionado à doença de Alzheimer em modelos animais [46]. Considerando o resultado desse estudo, o marcador RAGE para avaliar a proteção e prognóstico dessas doenças elencadas será RAGE primer forward TAGCTCCTGGTGGAAACCGTA e primer reverse CTCCTCGCCTGGTTATCCTTC. Há controversas entre os pesquisadores quanto a ação do RAGE no diabetes; segundo alguns autores, pacientes com diabetes tipo II com níveis plasmáticos baixos de sRAGE desenvolviam microangiopatia mais severas juntamente com retinopatia e nefropatia do que aqueles pacientes cujo nível de sRAGE era normal ou alto [48]. Outros autores afirmaram que estudos realizados em ratos diabéticos com déficit de RAGE tiveram retardo na doença renal expressando mediadores com baixas ações inflamatórias e fibróticas renais e apresentaram resistência a apoptose das células do rim quando comparados a animais selvagens, e a terapia com anticorpos anti-RAGE em modelos murinos diabéticos induzidos por estreptozotocina e modelos murinos diabéticos obesos tipo II apresentaram melhora no quadro de lesão renal, e a deleção de RAGE foi capaz de amenizar a glomerulosclerose [47]. Estudos relacionados à superexpressão de RAGE, em ratos portadores de diabetes, concluíram que esse aumento causa lesão por estresse oxidativo vascular e o seu déficit ameniza o estresse oxidativo cardíaco, a lesão de reperfusão isquêmica e diminui o desenvolvimento da aterosclerose [23], mostrando que esse mesmo marcador identificado no presente estudo também tem um potencial de modulador na resposta imunológica.

O IL1R1 é especificamente ativado por duas isoformas de interleucina1, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e esta ligação da IL-1 ao seu IL1R1 desencadeia a ativação de quinases resultando na estimulação de rotas de sinalização induzidos por estresse e transcrição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, que elevam o fluxo sanguíneo, aumentam a migração das células de defesa e degradam matriz celular [8]. É encontrado em todo sistema nervoso central e está envolvido em neuropatias [24] e nefropatias [25]. Estudos realizados com antagonistas de IL1R1 demonstram melhora no quadro isquêmico no acidente vascular cerebral [26]. Considerando o que se sabe sobre este receptor, o potencial marcador para avaliação da resposta imunológica em neuropatias e nefropatias será IL1R1 primer forward TCAGCAGGCTTCATTTGGGA e primer reverse AGGGTGCGTCTACCGTCT, onde o aumento da expressão do mesmo implicará em agravamento do quadro, pelo aumento da resposta inflamatória via liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8.

Dentre os PRRs, os NLRs e os receptores AIM2, podem reconhecer os DAMPs e formar os inflamossomas, que são plataformas com várias proteínas, construídas no citosol, desempenhando papel crítico na resposta imune inata [27,49]. A maioria dos inflamossomos canônicos apresentam três componentes sendo um sensor (NLRs e receptor AIM2), um adaptador e um efetor como a caspase 1 e caspase 11 em camundongos e caspase 4 e 5 em humanos [52]. O adaptador mais conhecido é a proteína speck-like ligada a apoptose e apresenta um domínio de recrutamento de caspases (ASC) e, nesse caso forma-se o inflamossoma dependente de ASC, e enzima efetora pro-caspase 1 [52,53]. A ativação da caspase promove a proteólise da pro-interleucina-1 $\beta$  e pro-interleucina-18 (pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18) e a IL-1 $\beta$  ativa a cascata de sinalização do receptor de IL que irá converter a sinalização de TLR via MyD88, estimulando assim a transcrição de genes pró-inflamatórios [52]. Apresentam 3 domínios estruturais como o domínio C terminal, rico em repetições de leucina (LRR); o domínio NACHT que é um domínio central de ligação a nucleotídeos (NOD) e um domínio efetor iniciador da sinalização, que pode ser CARD (domínios de ativação e recrutamento de caspases), PYD (domínio de pirina) ou BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*) e são subdivididos em subfamílias como NLRC e NLRP. Na subfamília de NLRCs, destacam-se os receptores de domínios de oligonização e nucleotídeo NOD1 e NOD2, que promovem a sinalização da inflamação através da via de ativação da quinase e da caspase. Na subfamília NLRPs, encontram-se o NLRP1 e o NLRP3, importantes ativadores de inflamossomas que compreendem a proteína adaptadora ASC (domínio de recrutamento de caspase) e a caspase-1, e os DAMPs são responsáveis pela indução da transcrição, tradução e liberação de proteínas inflamatórias [27,52]. De todos os inflamossomas, o que está bem caracterizado e envolvido na inflamação estéril é o NLR que contém 3 domínios de pirina (NLRP3), e está envolvido em várias patologias, como as patologias neurodegenerativas, aterosclerose, diabetes, lesões cardíacas e cerebrais [27]. Para a avaliação dessas patologias sob aspecto diagnóstico e prognóstico, os potenciais marcadores descritos nesse estudo são AIM2 primer forward GCCGTCCAGAAGTGTCAGAG e primer reverse , CARD 6 primer forward ACAGAAAAAGGGAGAGGCGA e primer reverse TTAAACTTCATGCCTTAAGCCGC, NOD1 primer forward AACCTGGTGGCCAAGTGAT e primer reverse TGTAATCGCCGCCACAATCT, NOD 2 primer forward AGGCTCTGTATTTGCGCGAT e primer reverse AGCTTAGCCATGGAGTGTGC e NLRP3 primer forward GAACTTTCTGTGTGGACCGA e primer reverse AAGTCCACATCCTCCAGGTC. Para

avaliar o prognóstico dessas enfermidades elencadas, o nível elevado da expressão destes receptores sugere agravamento do quadro, pois o aumento dos mesmos leva a uma maior formação de inflamossomas que ativará a IL-1 $\beta$ , levando ao progresso da resposta inflamatória.

O HMGB1 é uma proteína com ações múltiplas no núcleo, no citossol e na membrana [28]. Esta proteína pode ser liberada de células que estão em processo necrótico e lesionadas ou secretadas de células ativas do sistema imune como monócitos, macrófagos e células dendríticas [54] e podem se ligar a receptores RAGE e TLR2, TLR4 e TLR9 desencadeando resposta inflamatórias pela liberação de citocinas [28,54] e o TLR4 é considerado o receptor chave e, através de sua interação com o HMGB1 extracelular, ocorre a ativação do NF- $\kappa$ B, que promoverá a expressão de onde resulta na liberação de citocinas inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-11 e TNF- $\alpha$  dentre outras como as cicloxigenase (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no cérebro [31,55]. HMGB1 está relacionado a vários distúrbios como periodontite e doenças peri-implante, obesidade, resistência à insulina o que leva à diabetes tipo 2, e diabetes tipo 1 por induzir a morte das células  $\beta$ , hepatopatias, câncer, isquemia, convulsão, trauma cerebral, neurodegeneração, cardiopatias, dentre outras, sendo seu papel no câncer o de desenvolver a tumorigênese, auxiliando a angiogênese, a evasão apoptótica, invasão tecidual e metástases [12,28–32,49,56]. Por outro lado, no AVC (acidente vascular cerebral), o HMGB1 ligado ao TLR2 ativa vias de sinalização que protegem o cérebro, recrutando os oligodendrócitos e consequentemente, auxiliando a integridade da substância branca após instauração de quadro isquêmico [33]. O potencial marcador para HMGB1 relacionado a estas patologias será o forward primer AGCTGGCTGCTGCTCC e reverse primer CCCATGTTTAGTTATTTTCGTGC, onde o aumento de sua expressão agravará o quadro inflamatório, em todas essas doenças descritas, pela ativação de cascatas de sinalização com liberação de citocinas pró-inflamatórias, principalmente se ligado ao TLR4; sendo o prognóstico considerado ruim. No AVC, sua expressão aumentada confere proteção ao cérebro, caso esteja ligado ao TLR 2.

As proteínas de choque térmico (HSPs) são uma família multigênica que originam proteínas muito conservadas e que apresentam ações diferenciadas e estão envolvidas no reparo celular e nos mecanismos de proteção das células contra os diversos tipos de estresse. Essas moléculas intermedeiam o enovelamento ou dobramento de outras proteínas, ou seja, atuam como chaperonas moleculares, garantindo que essas proteínas não mudem suas conformações nativas submetidas a condições estressantes; são proteínas intracelulares e sua

expressão é constitutivamente contida em condições homeostáticas ou proteostáticas. Em condições de estresse fisiológico, a expressão gênica destas proteínas é aumentada e elas são liberadas para o meio extracelular [8,34,57,58]. Os potenciais marcadores de acordo com esse estudo são HSP60 primer forward CGCCCCGCAGAAATGC e primer reverse TTTGGCATAAGCCCGAGTGA, HSP70 1LIKE primer forward GAGACTAGGCCTCAGAGAACCA e primer reverse CCTGGTCGTTGGCGATGAT, HSP70 4 primer forward ACACGAATCCCTGCGGTAAA e primer reverse CGATAAGATGGCACACTGCAA, HSP70 4LIKE primer forward TGCTTATAGGCTGCTGTTACTGG e primer reverse CGTTCGTGACTATCTGGCTCT, HSP70 5 primer forward ACCGCTGAGGCTTATTTGGG e primer reverse CTGCCGTAGGCTCGTTGATG, HSP70 9 primer forward TAGGATGCCCAAGGTTTCAGC e primer reverse AACACACCTCCCTGAATGGC, HSP70 12 primer forward GGACAGAGACCCGCACG e primer reverse GATGTGGGAGCCGTTTCTCG, HSP70 12B primer forward TACATCGAAACCCGAGGTCC e primer reverse GCATAGCCACTAGACGTGGT, HSP70 13 primer forward ACCCGAGCAATGTCTGGAAAC e primer reverse GGGCACGAAGCCATATGTTTG, HSP70 14 primer forward GGCAGAAGCTCCAGTGATCC e primer reverse TCTGGCAACATCTTCTGGGT, HSP90AA1 primer forward CCGTCGCTATATAAGGCAGGC e primer reverse GGTTTCCTCAGGCATCTTGGC, HSP90AB1 primer forward GCTGAAAATTGACATCTCCATGA e primer reverse GTGAAGGAACCTCCAGCAGA e HSP9B1 primer forward CCAGCACATCTGGGAGTCTG e primer reverse GACAAGGGTAATTGTCGTTCCC. As HSPs estão relacionadas a várias patologias como distúrbios neurodegenerativos, câncer e isquemia via TLR2 e TLR4 ativando cascatas de sinalização MDY88 E NF-κB [58] dentre outras doenças, podendo ser usadas como diagnóstico e/ou prognóstico. As funções imprescindíveis das HSPs são alteradas nos processos oncogênicos e o aumento da expressão de uma ou mais HSPs é uma característica marcante em neoplasias, sendo a expressão de HSP90 aumentada cerca de 2 a 10 vezes mais em células cancerosas comparado às células normais, e este fato faz com que ela se torne um poderoso alvo na terapia do câncer, pois seu bloqueio leva à degradação dos seus ligantes e estimula a morte tumoral através das células natural killer (NK) melhoradas [34]. Os marcadores HSP90 apresentados poderão avaliar o prognóstico do câncer e doenças neurodegenerativas, pois sua elevação confere piora no quadro por desencadear resposta

inflamatória via cascatas de sinalização. A HSP70 pode ser encontrada nos neurônios, micróglia, astrócitos e células endoteliais e sua ação no acidente vascular cerebral isquêmico é bem conhecida podendo desencadear a resposta imune das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> regulando negativamente TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , apresentando efeito protetor cerebral, mas com alguns efeitos colaterais [33] e também em otites. Os marcadores HSP70 descritos acima, quando elevados conferem proteção cerebral no AVC isquêmico tornando o prognóstico favorável a recuperação. As pequenas HSPs, como as HSP HIKESHI, HSP10 e HSPB, desempenham efeito protetor para catarata [35] e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson [36] e os marcadores apresentados nas Tabelas 22 e 23, podem se utilizados para avaliar o prognóstico dessas doenças pois a expressão elevada dos mesmos confere proteção aos tecidos lesionados. As HSP40, descritas na Tabela 22 estão envolvidas em câncer como o carcinoma hepatocelular fibrolamelar [37] e o aumento da sua expressão sugere o agravamento da doença.

As proteínas S100 representam um amplo grupo de proteínas de ligação ao cálcio [59] e estão relacionadas à vários tipos de câncer, obesidade, diabetes, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, doenças pulmonares, dentre outras [5,8,38,39], e apresentam grande potencial como biomarcadores [59,60]. As proteínas S100 são ligantes de RAGE, TLR4 via MyD88 e NLRP3 [38] e ativam cascatas de sinalização via NF- $\kappa$ B quando ligadas ao RAGE, MAPK, JAK-2 e STAT-3 [22,61]. Os potenciais marcadores para diagnóstico, proteção e prognóstico destas doenças estão apresentados na Tabela 24. As proteínas S100 apresentam ampla complexidade na progressão do câncer onde uma expressão aumentada ou diminuída interfere no prognóstico da doença, como no câncer de pâncreas onde pacientes tratados com terapia adjuvante e com nível elevado de S100A2 apresentam ótimo índice de sobrevivência e, em pacientes submetidos a pancreatectomia, baixos níveis de S100A2 melhoram o índice de sobrevivência e, níveis aumentados de S100A4 promovem resistência a quimioterapia e à radioterapia em células pancreáticas cancerosas [40]. Os marcadores em potencial para o prognóstico do câncer serão S100A2 primer forward AGAGGGCGACAAGTTCAAGC e primer reverse GGTTCTCTGGAATGCCCCAC que desempenha papel modulador da resposta imunológica, onde o aumento de sua expressão confere alta ou baixa proteção dependendo do tipo de tratamento ao qual o paciente foi submetido; e S100A4 primer forward TCTTGGTTTGATCCTGACTGCT e primer reverse TCACCCTCTTTGCCCGAGTA sendo a expressão aumentada desse marcador um fator indicativo de prognóstico desfavorável, por aumentar a resposta inflamatória. Outro exemplo

é a expressão elevada de S100B que está envolvida em transtornos do humor, baixa perfusão em hemorragia intracerebral [41] e também tem sido considerada um marcador prognóstico da fase aguda do dano neurológico [62] e o marcador potencial para avaliação deste transtornos, de acordo com este estudo será S100B primer forward CAAGGAAGAGGATGTCTGAGC e primer reverse TGATGAGCTCCTTCAGTTCGG cujo aumento de sua expressão desencadeia resposta inflamatória pela ativação de cascatas de sinalização o que leva a um mau prognóstico.

Para a análise de predição de epítomos de células B, foi utilizada a escala de antigenicidade de Kolaskar e Tongaonkar, com precisão de 75%, considerada a mais fidedigna [63], para previsão de determinantes antigênicos, que utiliza escala simples de antigenicidade baseada em propriedades físico-químicas e frequência de aminoácidos [64]. Neste estudo *in silico*, foi avaliado o epítomo linear por ser capaz de reconhecer antígenos desnaturados [64]. As células B conseguem identificar antígenos expostos a solventes por meio de seus receptores, levando à secreção de imunoglobulinas (anticorpos) que mediarão a resposta adaptativa humoral [64] ao passo que as células T necessitam da ligação do antígeno ao MHC (complexo principal de histocompatibilidade) expresso por APCs (células apresentadoras de antígenos) desencadeando a resposta adaptativa mediada por células [64,65]. A avaliação de imunogenicidade não é relevante no presente estudo. As Tabelas 14 a 20 apresentaram a seleção de epítomos com pontuação máxima, o que confere maior estabilidade estrutural do mRNA com potencial antigênico, que possam ser usados em ensaios sorológicos, favorecendo a construção de plataformas de imunodiagnóstico. A predição de epítomos destacadas são as que estão relacionados às melhores predições de estrutura secundária para PRRs e DAMPs. Em testes futuros, poderão ser testados anticorpos com intuito de bloquear estes PRRs e DAMPs, ou mesmo o uso de peptídeos sintéticos ou recombinantes como marcadores ou moduladores da resposta imune, auxiliando na compreensão dos mecanismos patológicos em humanos. Estudos prévios têm relacionado o TLR2 nas sinucleinopatias em idosos que são neuropatias que incluem doença de Parkinson e demência com corpos de Lewy, onde ocorre o acúmulo gradativo de  $\alpha$ -sinucleína nas células da glia e neurônios e, o uso de terapia com anticorpo bloqueador contra TLR2 suprimiu a expressão do gene da citocina induzida pela  $\alpha$ -sinucleína [43,45].

A análise de similaridade foi realizada considerando a possibilidade de estudos em modelos animais [66–69]. A análise do BLAST determinou sequências conservadas em algumas espécies e verificou que algumas sequências de nucleotídeos são exclusivas para o

*Homo sapiens*. Considerando os resultados apresentados, os receptores RAGE variante 3; o TLR 1, TLR2 variantes 1 a 6, TLR4 variantes 1, 3 e 4, TLR5, TLR6, TLR10, AIM2, NLRC3 variante 1, NLRC4, NLRC5 e NOD1 e os DAMPs HSP40A3, HSP40B1, HSP40C6 variantes 1 e 3, HSP40C21 variantes 1 e 3, HSP704LIKE, HSP7012A, HSP7012B, HSPB3, HSPB7, HSPB9, proteínas S100A2, S100A3, S100A4 variante 1, S100A5, S100A7, S100A7A, S100A12, S100A13, S100A16 variantes 1 e 2, S100P e S100Z, poderão ser utilizados exclusivamente em ensaios *in vitro* no ser humano. Para os demais PRRs e DAMPs, foi encontrado pelo menos uma espécie animal para ser usado como modelo experimental [66–69].

## **Conclusão**

Esta análise *in silico* promoveu a seleção de DAMPs e seus receptores envolvidos em patologias inflamatórias que acometem o ser humano, elencando sequências alvos com potencial de avaliar prognóstico ou para intervenção imunológica, através da modulação imune.

## **Perspectivas Futuras**

A perspectiva futura é continuar na mesma linha de pesquisa, realizando ensaios *in vitro* e *in vivo* das sequências desenhadas, no intuito de criar plataformas de diagnóstico ou moduladores imunológicos.

## **Tabelas**



Tabela 1. RAGE: Predição de energia livre mínima mRNA

Variante	MFE
1	-618,4
2	-627,6
3	-605,9
4	-578,4
5	-555,4
6	-571,5
7	-559,2
8	-514,4
9	-534,1

RAGE (receptor for advanced glycation end-products)

MFE (minimum free energy)

Tabela 2. TLR: Predição de energia livre mínima mRNA

Receptor	Variante	MFE
TLR 1		-728,5
TLR 2	1	-1102,4
	2	-1043,6
	3	-1044,0
	4	-1030,2
	5	-1034,9
	6	-1029,7
	7	-1020,6
	8	-1019,8
TLR 3		-702,7
TLR 4	1	-1570,9
	3	-1600,2
	4	-1522,8
TLR 5		-1196,3
TLR 6		-1695,4
TLR 7		-1317,5
TLR 8	1	-1123,5
	2	-1077,2
TLR 9		-1564,1
TLR 10	1	-1044,8
	2	-897,7
	3	-984,6
	4	-955,7
	5	-958,4

TLR (Toll-like receptor), MFE (minimum free energy)

Tabela 3. IL1R1: Predição de energia livre mínima mRNA

Variante	MFE
1	-1524,2
2	-1052,5
3	-1429,9
4	-1474,4
5	-1438,9
6	-1419,9
7	-1361,2
8	-1334,3
9	-1332,7
10	-240,5

IL1R1 (Interleukin-1 receptor), MFE (minimum free energy)

Tabela 4. AIM2 e NLRs: Predição de energia livre mínima mRNA

Receptor	Variante	MFE
AIM 2	1	-359,9
	2	-332,7
CARD 6		-1193,0
NLRC 3	1	-2562,5
NLRC 4	1	-1012,1
	2	-988,0
	3	-966,2
	4	-364,9
NLRC 5	1	-2759,2
	2	-2776,9
NOD 1	1	-1739,0
	2	-1741,5
NOD 2	1	-1756,3
	2	-1735,4
NLRP 1	1	-2126,1
	2	-2089,8
	3	-2088,4
	4	-2051,7
	5	-1936,6
NLRP 3	1	-1542,1
	2	-1425,8
	3	-1334,9
	4	-1502,0
	5	-1481,1
	6	-1542,1

AIM2 (absent in melanoma 2), NLRs (Nod-Like Receptors), MFE (minimum free energy)

Tabela 5. HSP HIKESHI e HSP 10: Predição de energia livre mínima mRNA

DAMPs	Família	Membro	Variante	MFE
HSP HIKESHI			1	-333,6
			5	-307,9
			6	-377,0
			7	-356,5
HSP 10	HSPE	1		-317,0

HIKESHI (heat shock protein nuclear import factor), HSP (heat shock protein), MFE(minimum free energy)

Tabela 6. HSP 40: Predição de energia livre mínima mRNA (continua)

DAMPs	Família	Membro	Variante	MFE
HSP40	DNAJ	A1	1	-666,9
			2	-613,6
		A2		-858,8
		A3	1	-1044,0
			2	-999,8
			3	-893,4
		B1	1	-884,5
			2	-837,3
			3	-735,6
		B2	1	-864,2
			2	-1406,9
		B4	1	-717,5
			2	-682,9
			3	-822,0
			4	-779,4
			5	-626,3
			6	-548,3
		B6	1	-809,6
			2	-420,4
			4	-697,7
		B9		-689,9
		B11		-517,7
		B14	1	-1396,6
			2	-1351,4
			3	-237,6
		C1		-723,4
		C2	1	-591,6
			2	-547,1
			3	-559,1
		C3		-1515,8
		C5		-2212,0
		C5B	1	-550,7
			2	-514,0
		C5G	1	-611,2
			2	-586,4
			3	-530,2
		C6	1	-1704,7
			2	-1609,0
			3	-1640,8
C7	1	-665,5		

Tabela 6. HSP 40: Predição de energia livre mínima mRNA (conclusão)

		2	-535,1
	C8	1	-527,2
	C9		-695,8
	C11		-1227,3
	C12	1	-315,1
		2	-219,7
	C15		-751,7
	C16	1	-1785,0
		2	-1721,2
	C17		-356,2
	C18		-1602,5
	C19	1	-406,0
		2	-386,1
	C21	1	-1648,0
		2	-1623,2
		3	-1613,4
	C22	1	-1668,7
	C24		-969,1
	C25	1	-665,7
	C27	1	-1434,9
		2	-1388,6
	C28	1	-429,1
		2	-337,1
		3	-327,9
	C30		-940,6

HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy)

Tabela 7. HSP 60: Predição de energia livre mínima mRNA

DAMPs	Família	Membro	Variante	MFE
HSP 60	HSPD	1	1	-629,2
			2	-651,5

HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy)

Tabela 8. HSP 70: Predição de energia livre mínima mRNA

DAMPs	Família	Membro	Variante	MFE
HSP 70	HSPA	1A		-951,0
		1B		-1003,0
		1 LIKE		-953,7
		2		-1016,9
		4		-987,8
		4 LIKE	1	-1039,6
			2	-1020,6
			3	-891,4
			4	-1020,4
		5		-1250,5
		6		-961,1
		8	1	-794,5
			2	-675,6
		9		-1062,2
		12A	1	-1924,2
			2	-1870,7
		12B	1	-1431,2
2	-1429,5			
3	-1386,4			
13		-995,9		
14	1	-563,0		
	3	-1270,4		

HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy)

Tabela 9. HSP 90: Predição de energia livre mínima mRNA

DAMPs	Família	Membro	Variante	MFE
HSP 90	AA	1	1	-1171,1
			2	-931,1
	AB	1	1	-832,5
			2	-830,8
			3	-833,5
			4	-782,7
			5	-816,2
	B	1	-782,4	

HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy)

Tabela 10. HSP 110: Predição de energia livre mínima mRNA

DAMPs	Família	Membro	Variante	MFE
HSP 110	H	1	1	-1451,2
			2	-1416,3
			3	-1379,4
			4	-1309,1
			5	-1398,7

HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy)

Tabela 11. HSP B: Predição de energia livre mínima mRNA

DAMPs	Família	Membro	Variante	MFE	
HSP	B	1		-333,0	
				-344,3	
				-235,1	
				-436,1	
			7	1	-999,7
				2	-1224,0
				3	-1224,9
		4		-1209,8	
		8	5	-1208,0	
			6	-1211,6	
			7	-1213,5	
8	-1226,4				
9		-719,7			
		-278,6			
11	1		-237,4		
		2	-149,5		

HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy)

Tabela 12. HMGB1: Predição de energia livre mínima mRNA

DAMPs	Variante	MFE
HMGB1	1	-1394,5
	2	-1134,3
	3	-1116,5
	4	-1149,9

HMGB1( High Mobility Group Box 1), MFE (minimum free energy)

Tabela 13. S100: Predição de energia livre mínima mRNA

DAMPs	Membro	Variante	MFE
S100	A1		-206,9
	A2	1	-369,7
		2	-252,7
		3	-356,2
	A3		-282,7
	A4	1	-163,4
		2	-187,5
	A5		-257,1
	A6		-290,9
	A7		-113,0
	A7A		-1239,6
	A8	1	-178,2
		2	-174,5
		3	-136,3
		4	-171,9
		5	-164,1
	A9		-227,9
	A10		-383,0
	A11		-188,8
	A12		-125,6
	A13	1	-298,1
		2	-260,6
		3	-224,1
		4	-230,0
		5	-188,1
	A16	1	-581,7
2		-453,5	
3		-483,6	
B		-382,2	
G		-103,8	
P		-149,2	
Z		-314,4	

S100 (S100 protein), MFE (minimum free energy)



Tabela 14. RAGE, TLR, ILR-1: Predição de antigenicidade de epítomos

Receptor	Variante	Posição	Resíduo	Peptídeo	Score
RAGE	1 a 9	13	V	WVLVLSL	1.203
TLR 1		594	A	LVLAVTV	1.232
TLR 2	1 a 8	351	V	VFLVPCL	1.262
TLR 3		720	V	IFIVLLI	1.204
TLR 4	1	644	V	VLVVSVV	1.311
	3	604	V	VLVVSVV	1.311
	4	444	V	VLVVSVV	1.311
TLR 5		10	G	LLGVVL	1.234
TLR 6		599	A	LVLAVTV	1.232
TLR 7		988	L	VIIIFL	1.204
TLR 8	1	819	V	LVDVICA	1.216
	2	801	V	LVDVICA	1.216
TLR 9		968	L	VVVLVIL	1.312
TLR 10	1 a 4	597	C	VAFCCLH	1.245
	5	583	C	VAFCCLH	1.245
IL1R1	1 a 6	350	V	VIIVCSV	1.268
	7	206	V	VIIVCSV	1.268
	8	167	V	VIIVCSV	1.268
	9	115	V	VIIVCSV	1.268
	10	6	R	VLLRLIC	1.224

RAGE (receptor for advanced glycation end-products), TLR (Toll-like receptor), IL1R1 (Interleukin-1 receptor)

Tabela 15. AIM2 e NLRs: Predição de antigenicidade de epítomos

Receptor	Variante	Posição	Resíduo	Peptídeo	Score
AIM 2	1	156	V	CLPVMVL	1.224
	2	51	V	CLPVMVL	1.224
CARD 6		640	C	CLRCVSV	1.246
NLRC 3	1	90	L	LASLLL	1.208
NLRC 4	1 a 3	829	S	QLVSCCL	1.248
	4	164	S	QLVSCCL	1.248
NLRC 5	1 e 2	412	A	CQVACL	1.278
NOD 1	1 e 2	387	L	LCSLCSV	1.247
NOD 2	1	814	L	LPCLGVC	1.235
	2	787	L	LPCLGVC	1.235
NLRP 1	1 a 5	754	C	LLVCTFC	1.244
NLRP 3	1 a 5	416	W	LVCWIVC	1.269
	6	414	W	LVCWIVC	1.269

AIM2 (absent in melanoma 2), NLRs (Nod-Like Receptors)

Tabela 16. HMGB1, HIKESHI, HSPs 10 e 60: Predição de antigenicidade de epítomos

DAMPs	Variante	Posição	Resíduo	Peptídeo	Score
HMGB1	1 a 4	103	F	SAFFLFC	1.144
HIKESHI	1 e 5	38	V	HVVVFML	1.203
	6 e 7	136	N	IPANVVL	1.153
HSP 10		44	A	VLQATVV	1.198
HSP 60	1 e 2	445	L	CALLRCI	1.202

HMGB1( High Mobility Group Box 1), HIKESHI (heat shock protein nuclear import factor), HSP (heat shock protein)

Tabela 17. HSP 40: Predição de antigenicidade de epítomos (continua)

DAMPs	Membro	Variante	Posição	Resíduo	Peptídeo	Score
HSP 40	A1	1	110	Q	VVHQLSV	1.219
		2	111	E	QLVEALC	1.175
	A2		144	S	VLCSACS	1.221
	A3	1 e 2	289	C	ISPCVVC	1.260
		3	136	C	ISPCVVC	1.260
	B1	1	268	G	ALCGCTV	1.186
		2 e 3	168	G	ALCGCTV	1.186
	B2	1	7	I	YYEILDV	1.118
		2	321	C	ASRCLIL	1.145
	B4	1 e 2	264	G	ALCGCSI	1.168
		3	224	G	ALCGCSI	1.168
		4 e 5	149	G	ALCGCSI	1.168
		6	8	I	YYCILGI	1.166
	B6	1, 2 e 4	7	V	YYEVLGV	1.152
	B9		12	I	IFAICIL	1.182
	B11		13	L	CLLLLYL	1.260
	B14	1	259	L	IIVLILV	1.246
		2	192	L	IIVLILV	1.246
		3	40	L	LYPLPSA	1.124
	C1		37	L	LLLLLLA	1.223
	C2	1 e 2	28	V	LCQVEPV	1.194
		3	318	L	LASLQCL	1.179
	C3		19	L	PFLVLV	1.239
	C5		124	C	CCCCLCC	1.389
	C5B	1 e 2	129	L	CCCLCCC	1.389
	C5G	1 e 2	139	F	CCCFCCC	1.366
		3	46	C	CVLCSLV	1.300
C6	1	219	V	VCVHCL	1.333	

Tabela 17. HSP 40: Predição de antigenicidade de epítomos (conclusão)

		2	162	V	VCVVHCL	1.333
		3	149	V	VCVVHCL	1.333
	C7	1	216	R	LYVRGLC	1.172
		2	160	R	LYVRGLC	1.172
	C8	1	83	L	LSILVHP	1.174
	C9		150	C	SVLCVQY	1.231
	C11		493	Q	VPLQCLV	1.251
	C12	1 e 2	18	L	YYTLLGC	1.145
	C15		40	L	VRSLIAV	1.160
	C16	1	16	L	LIVLVLI	1.260
		2	76	V	KYCVVLL	1.253
	C17		207	L	VLNLVLS	1.186
	C18		236	L	LPVLVIV	1.266
	C19	1	7	A	TVVAVGL	1.178
		2	41	I	AALILGV	1.148
	C21	1 a 3	150	P	VVHPFYA	1.179
	C22	1	121	V	VLLVA AV	1.254
	C24		114	S	FYLSCRC	1.173
	C25	1	154	V	VILV SVC	1.282
	C27	1 e 2	130	V	IIFVVCA	1.234
	C28	1 a 3	104	S	KVL SHVI	1.174
	C30		98	Y	SQAYVVL	1.881

HSP (heat shock protein)

Tabela 18. HSP 70: Predição de antigenicidade de epítomos (continua)

DAMPs	Membro	Variante	Posição	Resíduo	Peptídeo	Score
HSP 70	1A e 1B		334	L	IHDLVLV	1.198
	1 LIKE		20	V	YSCVGVF	1.188
	2		443	V	SVLVQVY	1.227
	4		143	S	CVVSVPC	1.293
	4 LIKE	1	210	V	AYQVLVC	1.238
		2	241	V	AYQVLVC	1.238
		3	184	V	AYQVLVC	1.238
		4	169	V	AYQVLVC	1.238
	5		417	L	LVLLDVC	1.256
	6		336	V	IHDVVLV	1.217
	8	1 e 2	146	V	VVTVPAY	1.192
	9		435	V	VTDVLLL	1.184
	12	1	75	V	FLVVAV	1.277
		2	58	V	FLVVAV	1.277

Tabela 18. HSP 70: Predição de antigenicidade de epítomos (conclusão)

12B	1	513	P	VVVPHDV	1.224
	2	512	P	VVVPHDV	1.224
	3	427	P	VVVPHDV	1.224
13		221	V	VFHVLVI	1.250
14	1 e 3	15	V	SACVAVY	1.211

HSP (heat shock protein)

Tabela 19. HSP 90, HSP 110 e HSP B: Predição de antigenicidade de epítomos

DAMPs	Membro	Variante	Posição	Resíduo	Peptídeo	Score
HSP 90	AA1	1	717	S	LVTSPCC	1.206
		2	595	S	LVTSPCC	1.206
	AB1	1 a 3	587	S	LVSSPCC	1.221
		4 e 5	539	S	LVSSPCC	1.221
	B1		9	L	VLGLCCV	1.281
HSP 110	1	1,2 e 5	143	S	CVISVPS	1.203
			3	S	CVISVPS	1.203
			4	S	CVISVLG	1.209
HSP B	1		8	S	RVPFSL	1.132
			163	S	VYISLLP	1.182
			132	V	LSAVLCH	1.211
			77	L	FSVLLDV	1.176
		1	36	Q	SHCQVLW	1.153
		2	125	K	FAHKCQL	1.124
		3	129	K	FAHKCQL	1.124
		4	119	K	FAHKCQL	1.124
	8	5	115	P	CQLPEDV	1.120
		6	120	K	FAHKCQL	1.124
		7	124	K	FAHKCQL	1.124
9	8	130	K	FAHKCQL	1.124	
		101	N	VCVNVHS	1.208	
	134	L	CVALALP	1.212		
11	1 e 2	66	S	VIQSYFV	1.171	

HSP (heat shock protein)

Tabela 20. S100: Predição de antigenicidade de epítomos

DAMPs	Membro	Variante	Posição	Resíduo	Peptídeo	Score
S100	A1		79	V	VVLVAAL	1.254
	A2	1 a 3	11	A	QALAVLV	1.201
	A3		84	L	CLCLYCH	1.286
	A4	1 e 2	78	F	YCVFLSC	1.246
	A5		77	T	VFLTMLC	1.160
	A6		14	A	LLVAIFH	1.185
	A7		76	L	SEFLSLL	1.102
	A7A		55	L	IHYLATV	1.146
	A8	1 e 2	5	S	SLVSCLS	1.190
		3	82	L	FLILVIK	1.173
		4 e 5	74	L	FLILVIK	1.173
	A9		23	S	HQYSVKL	1.122
	A10		86	Y	CNDYFVV	1.153
	A11		19	A	SLIAVFQ	1.138
	A12		79	A	SLVAIAL	1.168
	A13	1 a 5	47	P	QQLPHLL	1.136
	A16	1 a 3	13	I	KAVIVLV	1.221
	B		12	I	VALIDVF	1.170
	G		74	V	QVLVKKI	1.149
	P		78	V	IVFVAAI	1.184
Z		79	V	VVMVAAL	1.193	

S100 (protein S100)

Tabela 21. Receptores: Desenho de *Primer*

Receptor	Forward Primer	Reverse Primer	Product Length
RAGE	TAGCTCCTGGTGGAAACCGTA	CTCCTCGCCTGGTTATCCTTC	91
TLR 1	CCAAATGGAACAGACAAGCAGG	ATGAAGACCCTGGCCACAAA	116
TLR2	AGGTGACTGCTCGGAGTT	TCCAGTGCTTCAACCTTCAC	111
TLR3	CGAGAGTGCCGTCTATTTGC	CATGATTCTGTTGGATGACTGC	98
TLR4	ATGCCAGGATGATGTCTGCC	GGATTTACACCTCCACGCA	112
TLR5	AGTCACCAAACCAGGGATGC	CTGAGGCTCCGACATCTTCC	147
TLR6	*	*	
TLR7	TCAAGAAAGTTGATGCTATTGGGC	GTGTCCACATTGGAAACACCAT	129
TLR8	AGTTTCTCTTCTCGGCCACC	GGAACATGTTTTCCATGTTTCTGT	103
TLR9	CCAGCATGGGTTTCTGCCG	TCACAGGGTAGGAAGGCAGG	112
TLR10	AGCCAATTCTGACCGTGTCAAC	ATGAAGATGAGCTCAAACCCCCA	90
IL1R1	TCAGCAGGCTTCATTTGGGA	AGGGTGCGTCTACCGTCT	121
AIM2	GCCGTCCAGAAGTGTGAGAG	GCTTATCAACTCCTGATCCCTGG	150
CARD 6	ACAGAAAAAGGGAGAGGCGA	TAAAACCTTCATGCCTTAAGCCGC	101
NLRC 3	GCAGCAATGACTCAAGGATACAG	TGAAGTCGTGTTCCCTCAGC	150
NLRC 4	GTTTGCCCTGTGTGACCTTG	ACTACTCTTCATTCCCTGTACCT	97
NLRC 5	TGTGCTGTGGCAGGTTCAACA	TCCACCTGGCTGAGGTCCTT	97
NOD 1	AACCTGGTGGCCAAGTGAT	TGTAATCGCCGCCACAATCT	90
NOD 2	AGGCTCTGTATTTGCGGAT	AGCTTAGCCATGGAGTGTGC	145
NLRP 1	GTGAAACCAGGAAGGAACACCAG	TCTGGCTTCATTGGTACTGCC	105
NLRP 3	GAACCTTCTGTGTGGACCGA	AAGTCCACATCCTCCAGGTC	113

\* *Primer* não desenhado

Tabela 22. HMGB1 e HSP: Desenho de *Primer*

HMGB1 HSP	e	ForwardPrimer	Reverse Primer	Product Lenght
HMGB1		AGCTGGCTGCTGCTCC	CCCATGTTTAGTTATTTTCGTGC	91
HIKESHI		GACTCATTCCTCAGGCCCA	GAGGGTTCTGTGCTAGTCGT	112
HSP10		TCGGGTTCTAAAGGAAAGGGTG	TTTGGTGCCTCCATATTCTGGG	90
HSP40A1		GAAGGAGAGAAGGTAAAAATGTTGT	AGCACTCTACTGCTCCTTTCT	150
HSP40A2		GTAGTGCATGCAGTGGCCAAG	CTGTTGTACCATCCCTGGAGC	116
HSP40A3		GGTGTCAGCCTTACAGGAAGAT	TGAACTCCTTGTTGACCCCC	141
HSP40B1		GGAAACCAAGGTAAGCGACG	CTCAGGGGACAGGATCTCAGAA	125
HSP40B2		ACCCGCAGATGTGTTCTGAG	GGCTCTACACTCAGCATGGG	132
HSP40B4		TGGGGAGGAAGGCATTGTGTG	CTTCTCCTCATTCCGGGTTTAC	106
HSP40B6		ACAAAGAGAATTGTCGAGAACGG	TCTGTTAAGTGCGTGCCTTG	136
HSP40B9		GAGATTAGGGTGCGTGCCAG	CTAATATCCTGCACCCTCCGAC	138
HSP40B11		GCTGTGAGGAGTGTGTGGAA	AATCTCGTCCGGCAATCACC	118
HSP40B14		GCACAAAGGACAGCACATCT	ATCACTCTTGTGTGTTAGGTACAG	140
HSP40C1		CCCACGAATTGGGTCGATCT	GTCTAACCATTCTGGGGAGC	90
HSP40C2		TGACCTCTGCCTCTACACTCT	CTCCAGTTCCTGAAAAGAGGCA	107
HSP40C3		CCACACACCTTTCTCCTCT	CTCCACATTACAGCACCTTCG	137
HSP40C5		GCGCTCACTGTCTACCTCTG	GGCAAGCTTCCGATAGGACT	100
HSP40C5B		CAAGGGAACATACAGATAACGGC	TGGTTATCCCTCTTGGTGTAGA	94
HSP40C5G		ATCCTACAGACACTTGTCTATCC	GGAGGCTGACTCTGGACATT	146
HSP40C6		GACCGCTGACTGTGAATGAC	GAGATGAGGCACCTTTATTTTCAG	125
HSP40C7		AGCTGAGGCATGGCCTTGTT	AAAGTCTCTGCTTCCCTCGCA	109
HSP40C8		AGACTGACCCGTCTGTT	ACCAAGATGGATAACTGCCGAA	120
HSP40C9		**	**	
HSP40C11		AATGGAAGGATGGGAGGTTGTG	CTTGGGATTGGTTCGCTGCT	118
HSP40C12		TCCGAGGGAAGAAGGACTGA	GCCAGGATTTGTTCAACCGAAG	128
HSP40C15		GCTCCAGTTGGCGAGAGTTT	GCGTAGCGACCTGCAAATG	149
HSP40C16		ACTTTCCCGGCATCCTGACAA	TCTGGTAGCCCTGGTTCTCTC	149
HSP40C17		GTAGTACGAATCCGTCAGGC	GCCTTCTTTACCTCTTTGTCCG	116
HSP40C18		CCTTCTCTTTACAGCTCGGG	ATGTAAGCTTCCGTCCAGCG	107
HSP40C19		TCACACTCACCAGGACACAA	GTAAGCTTACAGGAGTTC	143
HSP40C21		GCTGAACCACAAACAATGAGTG	TGCATGACCTGTGGCCTTTA	105
HSP40C22		CCGTGGATGTCTCTGCCTTA	CCTATCTGTAGTGCTCAAGCTG	104
HSP40C24		AAGTTAGCTAATCTGAGAAGGCC	TCTGCTCCCAGGATGCTGTA	96
HSP40C25		GCCTACGAGACTCAAGGATG	ACATCCACCTTAGGGGCCAA	125
HSP40C27		TGAGATGTTCCAGGATGAAGTC	CTTCACTGCCAGGTGCTACA	90
HSP40C28		ATTGTCCGTTTTCTGGTCA	CACTGTAGCCTTTATCAGGTGAG	110
HSP40C30		*	*	

HMGB1 (High MobilityGroup Box 1), HIKESHI (heat shock protein nuclear import factor), HSP (heat shock protein),

\* *Primer* não desenhado, \*\* *Primer* desenhado não atendeu aos requisitos da metodologia

Tabela 23. HSP: Desenho de *Primer*

HSP	Forward Primer	Reverse Primer	Product Length
HSP 60	CGCCCCGCAGAAATGC	TTTGGCATAAGCCCGAGTGA	96
HSP70 1 <sup>a</sup>	*	*	
HSP70 1B	*	*	
HSP70 1LIKE	GAGACTAGGCCTCAGAGAACCA	CCTGGTCGTTGGCGATGAT	127
HSP70 2	*	*	
HSP70 4	ACACGAATCCCTGCGGTA	CGATAAGATGGCACACTGCAA	120
HSP70 4LIKE	TGCTTATAGGCTGCTGTTACTGG	CGTTCGTGACTATCTGGCTCT	147
HSP70 5	ACCGCTGAGGCTTATTTGGG	CTGCCGTAGGCTCGTTGATG	148
HSP70 6	*	*	
HSP70 8	**	**	
HSP70 9	TAGGATGCCCAAGGTTTCAGC	AACACACCTCCCTGAATGGC	114
HSP70 12A	GGACAGAGACCCGCACG	GATGTGGGAGCCGTTTCTCG	124
HSP70 12B	TACATCGAAACCCGAGGTCC	GCATAGCCACTAGACGTGGT	90
HSP70 13	ACCCGAGCAATGTCTGGAAAC	GGGCACGAAGCCATATGTTTG	105
HSP70 14	GGCAGAAGCTCCAGTGATCC	TCTGGCAACATCTTCTGGGT	141
HSP90AA1	CCGTCGCTATATAAGGCAGGC	GGTTTCCTCAGGCATCTTGGC	111
HSP90AB1	GCTGAAAATTGACATCTCCATGA	GTGAAGGAACCTCCAGCAGA	144
HSP90B1	CCAGCACATCTGGGAGTCTG	GACAAGGGTAATTGTCGTTCCC	94
HSP110 1	TGTGGAGCAGATAACAGCCA	TGTTCCAGTACTGAAATAACACA	103
HSPB1	GAGATCACCGGCAAGCACGA	AGGAAACTTGGGTGGGGTCC	109
HSPB2	CTGCATCTGCAGCCATGTCG	CAGGAGGCCTTCTCCGAAGC	116
HSPB3	*	*	
HSPB6	TTTCGGTGCTGCTAGACGTG	GAATCCGTGCTCATCCGGG	116
HSPB7	AGAGGCCCTTAACTGCAACC	ATGGGCGGGTCCCTTGC	91
HSPB8	GCCAGAGGAGTTGATGGTGAA	CTCTGCAGGAAGCTGGATTTTC	127
HSPB9	*	*	
HSPB11	GTTTGGAACCTCGCAGAGGTTA	CAGGTGGGTGTTTTTCATCACT	114

HSP (heat shock protein), \* *Primer* não desenhado, \*\* *Primer* desenhado não atendeu aos requisitos da metodologia.



Tabela 24. S100: Desenho de *Primer*

S100	Forward Primer	Reverse Primer	Product Length
S100A1	CTTCCTGGATGCCCAGAAGGATG	GTTACAGGCCACTGTGAGAGC	130
S100A2	AGAGGGCGACAAGTTCAAGC	GGTTCTCTGGAATGCCCCAC	90
S100A3	GGCGCTGTGGGGACAAATA	CCCGAAACTCAGTCGGGGTC	93
S100A4	TCTTGGTTTGATCCTGACTGCT	TCACCCTCTTTGCCCCGAGTA	99
S100A5	GTTTCTGGGATTGGGGACGTG	TTTCCCTGATCTCTGTCCCTTCC	90
S100A6	CTCCCTACCGCTCCAAGC	CCGGAGTACTTGTGGAAGATGG	93
S100A7	AGTGCCTGTGACAAAAAGGG	TGCTCCATGGCTCTGCT	147
S100A7A	GTGCCTGTGACAAAAAGGGC	CGCTCCATGGCTCTGCT	146
S100A8	CATCAGCTGTAATGTGGGGCAA	ATCCCTGTAGACGGCATGGAA	131
S100A9	TCCGCTTTGACAGAGTGCAA	GCCCCAGCTTCACAGAGTAT	106
S100A10	GCCGCACGTACTAAGGAAGG	GTGGTCCGTTGAAGCCTTGG	115
S100A11	GTCCCTGATTGCTGTCTTCCA	GGGTCCTTCTGGTTCTTTGTG	126
S100A12	ATTCCTGTGCATTGAGGGGTTA	TGTCAAAATGCCCTTCCGA	117
S100A13	GAGCGGTTAGAGTGTGTGTGG	AGGGCTGACAGGTCATAAGGTTG	99
S100A16	TGCTGTCCGACACAGGGAAC	GGTGATGCCGCCTATCAAGG	116
S100B	CAAGGAAGAGGATGTCTGAGC	TGATGAGCTCCTTCAGTTCGG	123
S100G	CACTATTGGGCAACCAGACACC	GTCTGGATCACCTTCTTTGGCT	100
S100P	CAGGCTTCCTGCAGAGTGGAA	CGTGATTGCAGCCACGAACA	122
S100Z	CTTCCACCGCTATTCTGGCA	GGGTTTCCTTTTGGCACGAG	113

S100 (protein S100)

Tabela 25. Validação *primers* de receptores

Receptor	%GC F/R	Tm F/R(°C)	Ta (°C)
RAGE	55/57	61,9/61,5	65,0
TLR 1	50/50	61,4/ 61,6	64,9
TLR2	55/50	59,9/59,7	63,3
TLR3	55/45	60,3/58,9	62,3
TLR4	55/55	62,0/62,2	65,5
TLR5	55/60	62,1/61,5	65,0
TLR7	41/45	61.1/60.9	64,4
TLR8	55/37	61.4/59.7	63,3
TLR9	63/60	63,4/62,9	66,4
IL1R1	50/61	61,6/62,0	65,1
AIM2	60/52	61,8/62,0	65,3
CARD 6	50/41	60,8/61,8	64,4
NLRC 3	47/55	60,9/61,6	64,4
NLRC 4	55/43	61,1/59,8	63,4
NLRC 5	55/55	64,4/62,2	66,3
NOD 1	52/50	61,3/61,8	64,9
NOD 2	50/55	61,8/62,1	65,3
NLRP 1	52/52	63,0/62,0	65,5
NLRP 3	50/55	59,3/60,6	62,9

%GC F/R (percentagem GC forward/reverse), Tm (Melting Temperature),  
Ta (Annealing Temperature)

Tabela 26. Validação *primers* HMGB1, HSP10 e HSP40

HMGB1 e HSP	%GC F/R	Tm F/R (°C)	Ta (°C)
HMGB1	68/37	61,5/58,3	62,0
HIKESHI	55/55	61,2/60,7	64,3
HSP10	50/50	61,6/62,1	65,1
HSP40A1	36/47	58,7/60,2	62,4
HSP40A3	50/55	61,4/61,5	64,9
HSP40B1	55/57	60,5/62,9	64,1
HSP40B2	55/60	61,7/61,8	65,1
HSP40B6	43/50	60,4/60,6	64,0
HSP40B9	60/54	62,3/61,5	65,0
HSP40B11	55/55	61,6/62,0	65,1
HSP40B14	50/41	60,3/59,5	63,1
HSP40C1	55/57	61,5/61,8	65,0
HSP40C2	52/50	61,5/61,8	65,0
HSP40C3	55/55	60,9/60,3	63,9
HSP40C5	60/55	61,5/61,3	64,8
HSP40C5B	47/43	60,7/60,3	63,9
HSP40C5G	45/55	58,8/60,9	62,4
HSP40C6	55/41	60,2/59,0	62,7
HSP40C8	55/45	62,3/61,4	64,5
HSP40C11	50/55	62,1/62,6	65,5
HSP40C12	55/60	61,6/61,6	65,1
HSP40C15	55/57	62,2/61,2	64,7
HSP40C16	52/57	63,9/62,5	65,9
HSP40C17	52/57	59,2/60,5	62,8
HSP40C18	60/55	61,7/62,0	65,2
HSP40C19	50/52	60,7/59,2	62,9
HSP40C21	45/50	59,8/61,5	63,4
HSP40C22	50/50	60,9/59,6	63,2
HSP40C24	45/55	61,6/62,4	65,1
HSP40C25	54/55	61,8/63,1	65,3
HSP40C27	47/55	61,3/61,7	64,9
HSP40C28	45/47	59,1/59,8	62,8

HMGB1( High Mobility Group Box 1),HSP (heat shock protein),  
 %GC F/R (percentagem GC forward/reverse), Tm (Melting Temperature),  
 Ta (Annealing Temperature)

Tabela 27. Validação *primers* HSP60, HSP70, HSP90, HSP110 e HSPB

HSP	%GC F/R	Tm F/R (°C)	Ta (°C)
HSP 60	68/50	60,9/61,5	64,4
HSP70 1LIKE	54/57	62,3/61,8	65,3
HSP70 4	50/47	61,4/60,4	63,9
HSP70 4LIKE	47/52	61,9/61,0	64,5
HSP70 5	55/60	62,2/62,5	65,6
HSP70 9	55/55	61,6/62,1	65,1
HSP70 12A	70/60	61,5/62,5	65,0
HSP70 12B	55/55	60,8/61,1	64,4
HSP70 13	52/52	62,5/61,5	65,0
HSP70 14	60/50	62,1/60,9	64,5
HSP90AA1	57/57	62,1/63,2	65,5
HSP90AB1	39/55	58,7/61,1	62,4
HSP90B1	60/50	61,8/60,6	64,1
HSP110 1	50/37	60,9/59,5	63,1
HSPB6	55/63	62,0/62,2	65,5
HSPB7	55/68	61,8/61,6	65,1
HSPB8	52/50	61,7/60,9	64,5
HSPB11	47/45	59,7/60,6	63,3

HSP (heat shock protein), %GC F/R (percentagem GC forward/reverse),  
Tm (Melting Temperature), Ta (Annealing Temperature)

Tabela 28. Validação *primers* S100

S100	%GC F/R	Tm F/R (°C)	Ta (°C)
S100A2	55/60	62,2/62,5	65,7
S100A4	45/55	61,3/62,5	64,8
S100A5	57/52	62,8/63,1	66,2
S100A6	66/54	61,3/61,8	64,5
S100A7	50/58	60,3/60,5	63,9
S100A7A	55/64	61,7/61,4	64,9
S100A8	50/52	62,8/62,9	66,2
S100A9	50/55	61,8/61,3	64,8
S100A10	60/60	62,2/63,1	65,6
S100A11	52/52	61,7/60,3	63,9
S100A12	45/50	61,5/61,8	65,0
S100A13	57/52	62,3/63,9	65,7
S100B	52/52	59,6/61,3	63,2
S100G	54/50	62,9/61,9	65,4
S100Z	55/55	61,8/61,2	64,7

S100 (S100 Protein), %GC F/R (percentagem GC forward/reverse),  
Tm (Melting Temperature), Ta (Annealing Temperature)

## Referências

1. Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology* [Internet]. 148(2), 125–39 (2016). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26878338>.
2. Bergman P, Seyedoleslami Esfahani S, Engström Y. Drosophila as a Model for Human Diseases—Focus on Innate Immunity in Barrier Epithelia. *Curr. Top. Dev. Biol.* [Internet]. 121, 29–81 (2017). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0070215316301430?via%3Dihub>.
3. Wu X, Valli A, García J, *et al.* The Tug-of-War between Plants and Viruses: Great Progress and Many Remaining Questions. *Viruses* [Internet]. 11(3), 203 (2019). Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/3/203>.
4. Fleshner M. Stress-evoked sterile inflammation, danger associated molecular patterns (DAMPs), microbial associated molecular patterns (MAMPs) and the inflammasome. *Brain. Behav. Immun.* [Internet]. 27(1), 1–7 (2013). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22964544>.
5. Srikrishna G, Freeze HH. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia* [Internet]. 11(7), 615–28 (2009). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19568407>.
6. Nakahira K, Hisata S, Choi AMK. The Roles of Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns in Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* [Internet]. 23(17), 1329–1350 (2015). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26067258>.
7. Shao Y, Nanayakkara G, Cheng J, *et al.* Lysophospholipids and Their Receptors Serve as Conditional DAMPs and DAMP receptors in Tissue Oxidative and Inflammatory Injury Total number of figures and tables: 3 greyscale and 2 color illustrations. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. (2017). Available from: <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7069>.
8. Turner NA. Inflammatory and fibrotic responses of cardiac fibroblasts to myocardial damage associated molecular patterns (DAMPs). *J. Mol. Cell. Cardiol.* [Internet]. 94, 189–200 (2016). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26542796>.
9. Iwata M, Ota KT, Duman RS. The inflammasome: Pathways linking psychological

- stress, depression, and systemic illnesses. *Brain. Behav. Immun.* [Internet]. 31, 105–114 (2013). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261775>.
10. Kuramochi M, Izawa T, Pervin M, Bondoc A, Kuwamura M, Yamate J. The kinetics of damage-associated molecular patterns (DAMPs) and toll-like receptors during thioacetamide-induced acute liver injury in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* [Internet]. 68(8), 471–477 (2016). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27522298>.
  11. Rani M, Nicholson SE, Zhang Q, Schwacha MG. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) released after burn are associated with inflammation and monocyte activation. *Burns* [Internet]. 43(2), 297–303 (2017). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28341255>.
  12. Zhang J, Zhang L, Zhang S, *et al.* HMGB1, an innate alarmin, plays a critical role in chronic inflammation of adipose tissue in obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* [Internet]. 454, 103–111 (2017). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28619625>.
  13. Wu Y, Shi B, Ding X, *et al.* Improved prediction of RNA secondary structure by integrating the free energy model with restraints derived from experimental probing data. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. 43(15), 7247–59 (2015). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26170232>.
  14. Xu ZZ, Mathews DH. Secondary Structure Prediction of Single Sequences Using RNAstructure [Internet]. Humana Press, New York, NY, 15–34 (2016) [cited 2019 Feb 7]. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6433-8\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6433-8_2).
  15. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* [Internet]. 69(3), 89–95 (2001). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1067/mcp.2001.113989>.
  16. Wadsworth S, Sin D, Dorscheid D. Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. *J. Asthma Allergy* [Internet]. 4, 77–86 (2011). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21792321>.
  17. Mathews DH, Disney MD, Childs JL, Schroeder SJ, Zuker M, Turner DH. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Internet]. 101(19), 7287–92 (2004). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15123812>.

18. Lu ZJ, Gloor JW, Mathews DH. Improved RNA secondary structure prediction by maximizing expected pair accuracy. *RNA* [Internet]. 15(10), 1805–13 (2009). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19703939>.
19. Chuang L-Y, Cheng Y-H, Yang C-H. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol. Lett.* [Internet]. 35(10), 1541–1549 (2013). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-013-1249-8>.
20. Rasit Ozturk A, Can T. A multiplex primer design algorithm for target amplification of continuous genomic regions. . Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5477098/pdf/12859\\_2017\\_Article\\_1716.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5477098/pdf/12859_2017_Article_1716.pdf).
21. Ivády G, Madar L, Dzsudzsák E, *et al.* Analytical parameters and validation of homopolymer detection in a pyrosequencing-based next generation sequencing system. *BMC Genomics* [Internet]. 19(1), 158 (2018). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29466940>.
22. Khan MI, Su Y-K, Zou J, Yang L-W, Chou R-H, Yu C. S100B as an antagonist to block the interaction between S100A1 and the RAGE V domain. *PLoS One* [Internet]. 13(2), e0190545 (2018). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29444082>.
23. Yu Y, Wang L, Delguste F, *et al.* Advanced glycation end products receptor RAGE controls myocardial dysfunction and oxidative stress in high-fat fed mice by sustaining mitochondrial dynamics and autophagy-lysosome pathway. *Free Radic. Biol. Med.* [Internet]. 112, 397–410 (2017). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584917307281?via%3Dihub>.
24. Ferrara-Bowens TM, Chandler JK, Guignet MA, *et al.* Neuropathological and behavioral sequelae in IL-1R1 and IL-1Ra gene knockout mice after soman (GD) exposure. *Neurotoxicology* [Internet]. 63, 43–56 (2017). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X17301729?via%3Dihub>.
25. Gehrke N, Hövelmeyer N, Waisman A, *et al.* Hepatocyte-specific deletion of IL1-RI attenuates liver injury by blocking IL-1 driven autoinflammation. *J. Hepatol.* [Internet]. 68(5), 986–995 (2018). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29366909>.
26. Pradillo JM, Murray KN, Coutts GA, *et al.* Reparative effects of interleukin-1 receptor

- antagonist in young and aged/co-morbid rodents after cerebral ischemia. *Brain. Behav. Immun.* [Internet]. 61, 117–126 (2017). Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159116305153>.
27. Gao L, Dong Q, Song Z, Shen F, Shi J, Li Y. NLRP3 inflammasome: a promising target in ischemic stroke. *Inflamm. Res.* 66(1), 17–24 (2017).
  28. Kang R, Chen R, Zhang Q, *et al.* HMGB1 in health and disease. *Mol. Aspects Med.* [Internet]. 40, 1–116 (2014). Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25010388>.
  29. Shi X, Li M, Huang K, *et al.* HMGB1 Binding Heptamer Peptide Improves Survival and Ameliorates Brain Injury in Rats after Cardiac Arrest and Cardiopulmonary Resuscitation. *Neuroscience* [Internet]. (2017). Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.052>:
  30. Yang R, Zou X, Tenhunen J, Tønnessen TI. HMGB1 and Extracellular Histones Significantly Contribute to Systemic Inflammation and Multiple Organ Failure in Acute Liver Failure. *Mediators Inflamm.* [Internet]. 2017, 1–6 (2017). Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28694564>.
  31. Feng A, Tu Z, Yin B. The effect of HMGB1 on the clinicopathological and prognostic features of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* [Internet]. 7(15), 20507–19 (2016). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26840258>.
  32. Tai N, Wong FS, Wen L. The role of the innate immune system in destruction of pancreatic beta cells in NOD mice and humans with type I diabetes. *J. Autoimmun.* [Internet]. 71, 26–34 (2016). Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27021275>.
  33. Gülke E, Gelderblom M, Magnus T. Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* [Internet]. 11, 1756286418774254 (2018). Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29854002>.
  34. Pennisi R, Ascenzi P, di Masi A. Hsp90: A New Player in DNA Repair? *Biomolecules* [Internet]. 5(4), 2589–2618 (2015). Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26501335>.
  35. Mymrikov E V, Daake M, Richter B, Haslbeck M, Buchner J. The Chaperone Activity and Substrate Spectrum of Human Small Heat Shock Proteins. *J. Biol. Chem.* [Internet].



- 292(2), 672–684 (2017). Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27909051>.
36. Carra S, Alberti S, Benesch JLP, *et al.* Small heat shock proteins: multifaceted proteins with important implications for life. *Cell Stress Chaperones* [Internet]. , 1–14 (2019). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12192-019-00979-z>.
  37. Tomasini MD, Wang Y, Karamafrooz A, *et al.* Conformational Landscape of the PRKACA-DNAJB1 Chimeric Kinase, the Driver for Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma. *Sci. Rep.* [Internet]. 8(1), 720 (2018). Available from:  
<http://www.nature.com/articles/s41598-017-18956-w>.
  38. Ahmad S, Khan H, Siddiqui Z, *et al.* AGEs, RAGEs and s-RAGE; friend or foe for cancer. *Semin. Cancer Biol.* [Internet]. 49, 44–55 (2018). Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28712719>.
  39. Van Linthout S, Tschöpe C. Inflammation – Cause or Consequence of Heart Failure or Both? *Curr. Heart Fail. Rep.* [Internet]. 14(4), 251–265 (2017). Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28667492>.
  40. Leclerc E, Vetter SW. The role of S100 proteins and their receptor RAGE in pancreatic cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* [Internet]. 1852(12), 2706–2711 (2015). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26435083>.
  41. Wang F, Zou Z-R, Yuan D, *et al.* Correlation between serum S100 $\beta$  protein levels and cognitive dysfunction in patients with cerebral small vessel disease: a case-control study. *Biosci. Rep.* [Internet]. 37(2) (2017). Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28143956>.
  42. Chen J-Q, Szodoray P, Zeher M. Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. . Available from: <https://link-springer-com.ez26.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007%2Fs12016-015-8473-z.pdf>.
  43. Kim C, Spencer B, Rockenstein E, *et al.* Immunotherapy targeting toll-like receptor 2 alleviates neurodegeneration in models of synucleinopathy by modulating  $\alpha$ -synuclein transmission and neuroinflammation. *Mol. Neurodegener.* [Internet]. 13(1), 43 (2018). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30092810>.
  44. Grishman EK, White PC, Savani RC. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome and interleukin-1 $\beta$  in the development and progression of type 1 diabetes. *Pediatr. Res.* [Internet]. 71(6), 626–632 (2012). Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22337228>.
45. Kim C, Ho D-H, Suk J-E, *et al.* Neuron-released oligomeric  $\alpha$ -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat. Commun.* [Internet]. 4, 1562 (2013). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463005>.
  46. Oh S, Son M, Choi J, Lee S, Byun K. sRAGE prolonged stem cell survival and suppressed RAGE-related inflammatory cell and T lymphocyte accumulations in an Alzheimer's disease model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [Internet]. 495(1), 807–813 (2018). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X1732212X?via%3Dihub>.
  47. Sanajou D, Ghorbani Haghjo A, Argani H, Aslani S. AGE-RAGE axis blockade in diabetic nephropathy: Current status and future directions. *Eur. J. Pharmacol.* [Internet]. 833, 158–164 (2018). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299918303194?via%3Dihub>.
  48. Wautier MP, Guillausseau PJ, Wautier JL. Activation of the receptor for advanced glycation end products and consequences on health [Internet]. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 11(4), 305–309 (2017). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871402116302089?via%3Dihub>.
  49. Shin JJ, Lee EK, Park TJ, Kim W. Damage-associated molecular patterns and their pathological relevance in diabetes mellitus. *Ageing Res. Rev.* [Internet]. 24(Pt A), 66–76 (2015). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26197086>.
  50. Bauer AK, Upham BL, Rondini EA, Tennis MA, Velmuragan K, Wiese D. Toll-like receptor expression in human non-small cell lung carcinoma: potential prognostic indicators of disease. *Oncotarget* [Internet]. , 1–16 (2017). Available from: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19463>.
  51. Drouin-Ouellet J, St-Amour I, Saint-Pierre M, *et al.* Toll-like receptor expression in the blood and brain of patients and a mouse model of Parkinson's disease. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* [Internet]. 18(6) (2014). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25522431>.
  52. Lu A, Wu H. Structural mechanisms of inflammasome assembly. *FEBS J.* [Internet]. 282(3), 435–444 (2015). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.13133>.

53. Jin T, Perry A, Jiang J, *et al.* Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity* [Internet]. 36(4), 561–71 (2012). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22483801>.
54. Mou K, Liu W, Han D, Li P. HMGB1/RAGE axis promotes autophagy and protects keratinocytes from ultraviolet radiation-induced cell death. *J. Dermatol. Sci.* [Internet]. 85(3), 162–169 (2017). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923181116310647?via%3Dihub>.
55. Liu J, Li R, Liu T, Rausch-Fan X, Wang M. High Mobility Group Box 1 Protein Level as a Novel Biomarker for the Development of Peri-Implant Disease. . Available from: [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports).
56. Liu J, Li R, Liu T, Rausch-Fan X, Wang M. High Mobility Group Box 1 Protein Level as a Novel Biomarker for the Development of Peri-Implant Disease. *Sci. Rep.* [Internet]. 7(1), 7027 (2017). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28765610>.
57. Paul S, Mahanta S. Association of heat-shock proteins in various neurodegenerative disorders: is it a master key to open the therapeutic door? *Mol. Cell. Biochem.* [Internet]. 386(1–2), 45–61 (2014). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24096700>.
58. Tolle LB, Standiford TJ. Danger-associated molecular patterns (DAMPs) in acute lung injury. *J. Pathol.* [Internet]. 229(2), 145–156 (2013). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23097158>.
59. Turnier JL, Fall N, Thornton S, *et al.* Urine S100 proteins as potential biomarkers of lupus nephritis activity. *Arthritis Res. Ther.* [Internet]. 19(1), 242 (2017). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29065913>.
60. Wang T, Huo X, Chong Z, Khan H, Liu R, Wang T. A review of S100 protein family in lung cancer. *Clin. Chim. Acta* [Internet]. 476, 54–59 (2018). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898117304539?via%3Dihub>.
61. Yang X, Wang H, Liang H, *et al.* Clinical significance of microRNA-449a in hepatocellular carcinoma with microarray data mining together with initial bioinformatics analysis. *Exp. Ther. Med.* [Internet]. 15(4), 3247–3258 (2018). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29545842>.

62. Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X. S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. *Front. Immunol.* [Internet]. 8, 1908 (2018). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29379499>.
63. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* [Internet]. 276(1–2), 172–174 (1990). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2890%2980535-Q>.
64. Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *J. Immunol. Res.* [Internet]. 2017, 2680160 (2017). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29445754>.
65. Paul S, Sidney J, Sette A, Peters B. TepiTool: A Pipeline for Computational Prediction of T Cell Epitope Candidates. *Curr. Protoc. Immunol.* [Internet]. 114, 18.19.1-18.19.24 (2016). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27479659>.
66. López-Díez R, Rastrojo A, Villate O, Aguado B. Complex tissue-specific patterns and distribution of multiple RAGE splice variants in different mammals. *Genome Biol. Evol.* [Internet]. 5(12), 2420–35 (2013). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24273313>.
67. Baldwin CL, Telfer JC. The bovine model for elucidating the role of  $\gamma\delta$  T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. *Mol. Immunol.* [Internet]. 66(1), 35–47 (2015). Available from: <https://www-sciencedirect.ez26.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0161589014002892>.
68. Horohov DW. The equine immune responses to infectious and allergic disease: A model for humans? *Mol. Immunol.* [Internet]. 66(1), 89–96 (2015). Available from: <https://www-sciencedirect.ez26.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0161589014002661>.
69. Adin CA, Gilor C. The Diabetic Dog as a Translational Model for Human Islet Transplantation. *Yale J. Biol. Med.* [Internet]. 90(3), 509–515 (2017). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28955189>.