



**REBECA LOUISE DE ARAUJO BARBOZA**

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

**LAVRAS – MG  
2019**

**REBECA LOUISE DE ARAUJO BARBOZA**

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

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas para a obtenção do título de Bacharel.

Profa. Dra. Ana Paula Peconick  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2019**

**REBECA LOUISE DE ARAUJO BARBOZA**

**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.**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 18 de novembro de 2019.

Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dr. Wanderley Bittencourt	UFLA
MSc Érika Aparecida Oliveira	UFLA

Profa. Dra. Ana Paula Peconick  
Orientadora

**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).**

Barboza, Rebeca Louise Araujo.  
Avaliação in silico de padrões moleculares associados ao dano  
(DAMPs) e seus receptores em seres humanos. / Rebeca Louise  
Araujo Barboza. - 2019.  
62 p.

Orientador(a): Ana Paula Peconick.

TCC (graduação) - Universidade Federal de Lavras, 2019.  
Bibliografia.

1. Bioinformatica. 2. mRNA. 3. Sistema imunológico. I.  
Peconick, Ana Paula. II. Título.

Copyright © 2013 by Editora e Distribuidora Educacional S.A.  
Todos os direitos reservados.

*A minha mãe, Tania, a quem devo tudo que sou*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter permitido por viver uma experiência com pessoas incríveis, onde aprendo cada vez mais com elas.

À minha abençoada família, que sempre demonstrou todo apoio as minhas escolhas e vitórias.

A minha mãe, Tania que eu amo muito e que sempre me apoiou e orientou, dando força para todas as minhas decisões e por seu amor incondicional.

Ao meu querido irmão Alysson, por seu apoio, conselhos, piadas e momentos divertidos, companheirismo e cumplicidade.

À minha madrinha Leninha e primas Debora e Andreza, por toda ajuda, apoio, incentivo e carinho.

Ao Wanderley por todas as idas ao cinema, pela melhor companhia possível para almoços no RU, por toda a farra que passamos juntos, e claro a melhor maionese caseira já feita.

Ao Lucas Januzzi, por toda ajuda e momentos marcantes que contribuíram para minha jornada acadêmica.

À Erika pela parceria, ensinamentos, pela amizade, por me proporcionar momentos e conhecimentos incríveis, e por desenvolver um trabalho incrível juntas.

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

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

À CAPES, ao CNPq e FAPEMIG, pelo apoio.

A todos que de alguma forma me ajudaram e fizeram parte desse momento.

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

À querida orientadora Ana Paula Peconick, pelo empenho, paciência, dedicação, amizade. Por ser sempre feliz, passar uma energia que sempre nos anima a continuar o que quer que seja. Por sempre compreender as dificuldades, limitações, tropeços e sempre nos ajudar a levantar. Agradeço a Deus por ele ter permitido que você fizesse parte da minha história. Minha eterna gratidão, admiração e apreço.

*Não importa o que aconteça, continue a nadar*  
(Walters, Graham; Dori, Procurando Nemo, 2003)

## RESUMO

Os Padrões Moleculares Associados ao Dano (Damps) são moléculas intracelulares lançadas ao meio extracelular após ocorrer uma lesão celular e são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), que ativam o sistema imune inato. Existem vários tipos de PRRs, entre eles temos os Receptores Toll-like (TLRs). Encontram-se diretamente envolvidas na etiopatogenia de doenças crônicas tais como câncer, diabetes, hepatopatias, cardiopatias; e também doenças neurodegenerativas. O presente trabalho teve como objetivo acompanhar o desenvolvimento de um projeto na pesquisa por diferentes DAMPs humanos e seus receptores que apresentaram potencial de determinar sequências alvos que possam vir a ser utilizadas para uma avaliação do prognóstico de doenças ou ainda como moduladores na resposta imunológica. Foram realizadas revisões bibliográficas e pesquisa em bancos de dados públicos para sequências nucleotídicas, foram feitas predições de mRNA secundários através de softwares online, e também realizou-se a predição de antigenicidade de epítomos de todas as sequências encontradas, através do ImmuneEpitopeDatabaseAnalysisResource, analisou-se também a similaridade entre mamíferos na qual se utilizou a ferramenta de plataforma BLAST, também realizou-se os desenhos de marcadores que foram desenhados a partir das sequências de mRNA que apresentaram a melhor predição de estrutura secundária, o software utilizado foi o Primer-BLAST. Foi realizada a triagem de sequências de aminoácidos (mRNA) dos DAMPs e de seus receptores onde foram gerados um total de 178 sequências: 24 sequências TLRs, 122 sequências HSP, e 32 sequências S100. Foram selecionados iniciadores que amplificam essas sequências nas melhores condições para se trabalhar como um marcador ou modulador imune.

**Palavras-chave:** Bioinformática. Doenças. mRNA. Sistema imunológico.

## ABSTRACT

Damage Associated Molecular Patterns (Damps) are intracellular molecules released into the extracellular environment after cell damage occurs and are recognized by pattern recognition receptors (PRRs), which activate the innate immune system. There are several types of PRRs, among them are Toll-like Receptors (TLRs). They are directly involved in the etiopathogenesis of chronic diseases such as cancer, diabetes, liver disease, heart disease; and also, neurodegenerative diseases. The present work aimed to follow the development of a research project for different human DAMPs and their receptors that have the potential to determine target sequences that may be used for an evaluation of disease prognosis or as modulators in the immune response. Bibliographic reviews and searches in public databases for nucleotide sequences were performed, secondary mRNA predictions were made through online software, and the antigenicity of epitopes of all sequences found was also predicted using ImmuneEpitopeDatabaseAnalysisResource. Also, the similarity between mammals in which the BLAST platform tool was used, we also made the marker designs that were drawn from the mRNA sequences that presented the best prediction of secondary structure, the software used was Primer-BLAST. Amino acid sequences (mRNAs) were screened from DAMPs and their receptors where a total of 178 sequences were generated: 24 TLRs sequences, 122 HSP sequences, and 32 S100 sequences. Primers were selected that amplify these sequences under the best conditions to work as a marker or immune modulator. Primer pairs have already been designed and are ready to be used for in vitro assays in future studies.

**Keywords:** Bioinformatics. Diseases. mRNA. Immune system.

## LISTA DE SIGLAS

A/T	Adenina/Timina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
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	Ciclooxigenase
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
F/R	Forward/Reverse
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
GC	Guanina/Citosina
HSPs	Proteínas do choque térmico
IFN	Interferon
IL-18	Interleucina 18
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta
Il-6	Interleucina 6
IL1R1	Interleukin-1 Receptor
iNOS	InducibleNitric Oxide Synthase
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
Kda	Kilodaltons
MAMPs	Padrões moleculares associados a microbiota
MAPK	Mitogen-ActivatedProteinKinase
MFE	MinimumFree Energy
MyD-88	MyeloidDifferentiationPrimary Response 88
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factorkappa-B
NK	Natural Killer
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
Pb	Pares de Base
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases

PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
RefSeq	Banco de Dados de Sequências de Referência
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	ReactiveOxygenSpecies
Ta	Temperatura de Anelamento
TLRs	Toll-like Receptors
Tm	Temperatura de Melting
TNF	Fator de necrose tumoral

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: TLR: Predição de energia livre mínima mRNA .....	27
Tabela 2: HSP HIKESHI e HSP 10: Predição de energia livre mínima mRNA .....	27
Tabela 3: HSP 40: Predição de energia livre mínima mRNA (Continua).....	27
Tabela 4: HSP 60: Predição de energia livre mínima mRNA .....	29
Tabela 5: HSP 70: Predição de energia livre mínima mRNA (Continua).....	29
Tabela 6: HSP 90: Predição de energia livre mínima mRNA .....	30
Tabela 7: HSP 110: Predição de energia livre mínima mRNA .....	30
Tabela 8: HSP B: Predição de energia livre mínima mRNA .....	30
Tabela 9: S100: Predição de energia livre mínima mRNA .....	30
Tabela 10: TLR: Predição de antigenicidade de epítomos .....	32
Tabela 11: HMGB1, HIKESHI, HSPs 10 e 60: Predição de antigenicidade de epítomos .....	32
Tabela 12: HSP 40: Predição de antigenicidade de epítomos (Continua).....	33
Tabela 13: HSP 70: Predição de antigenicidade de epítomos .....	34
Tabela 14: HSP 90, HSP 110 e HSP B: Predição de antigenicidade de epítomos .....	34
Tabela 15: S100: Predição de antigenicidade de epítomos.....	35
Tabela 16: TLR : Análise de similaridade com sequências de humanos .....	36
Tabela 17: HIKESHI e HSP: Análise de similaridade com sequências de humanos.....	36
Tabela 18: HSP 40: Análise de similaridade com sequências de humanos (Continua) .....	37
Tabela 19: HSP 60 e 70: Análise de similaridade com sequências em seres humanos.....	39
Tabela 20: HSP 90: Análise de similaridade com sequências de humanos.....	40
Tabela 21: HSP 110 e B: Análise de similaridade com sequências de humanos .....	41
Tabela 22: S100: Análise de similaridade com sequências de humanos.....	41
Tabela 23: Receptores TLR 1-10: Desenho de <i>Primer</i> .....	43
Tabela 24: HMGB1 e HSP: Desenho de <i>Primer</i> (Continua).....	43
Tabela 25: HSP: Desenho de <i>Primer</i> (Continua) .....	45
Tabela 26: S100: Desenho de <i>Primer</i> .....	47
Tabela 27: Validação <i>primers</i> de receptores .....	48
Tabela 28: Validação <i>primers</i> HMGB1, HSP10 e HSP40 (Continua).....	48
Tabela 28: Validação <i>primers</i> HMGB1, HSP10 e HSP40 (Conclusão).....	49
Tabela 29: Validação <i>primers</i> HSP60, HSP70, HSP90, HSP110 e HSPB (Continua) .....	49
Tabela 30: Validação <i>primers</i> S100.....	50

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS AO DANO (DAMPS).....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÃO (PRRS).....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1</b>	<b>RECEPTORES TOLL-LIKE (TLRS) .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>SUBSTÂNCIAS QUE SÃO RECONHECIDAS COMO DAMPS .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.1</b>	<b>PROTEÍNAS S100 .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.2</b>	<b>PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSP) .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>BIOINFORMÁTICA .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>SEQUÊNCIA UTILIZADAS .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>PREDIÇÃO DE MRNA SECUNDÁRIO.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3</b>	<b>PREDIÇÃO DE ANTIGENICIDADE DE EPÍTOPOS .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4</b>	<b>ANÁLISE DE SIMILARIDADE COM OUTROS MAMÍFEROS .....</b>	<b>25</b>
<b>3.5</b>	<b>DESENHO DE MARCADORES.....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>PREDIÇÃO DE MRNA SECUNDÁRIO.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>PREDIÇÃO DE ANTIGENICIDADE DE EPÍTOPOS .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>ANÁLISE DE SIMILARIDADE .....</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>DESENHO DE INICIADORES.....</b>	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>VALIDAÇÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A resposta imune inata faz parte do sistema de defesa imunológica de um organismo, onde é considerado um sistema de menor especificidade imunológica. As principais células que fazem parte do mesmo são as células dendríticas, células naturais killer, eosinófilos, fagócitos mononucleares, mastócitos e neutrófilos. Agentes patogênicos podem ativar a imunidade inata pelos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) de uma forma exógena e duas endógenas onde uma delas se dá pela perda de equilíbrio que foi causado por um agente estressor fazendo com que bactérias da flora intestinal sejam reconhecidas como estranhas pelos padrões moleculares associados a microbiota comensal (MAMPs). Os DAMPs são liberados no meio extracelular quando ocorre algum tipo de lesão na célula, onde é liberado por células necróticas e também matriz celular onde a partir disso desencadeia uma resposta inflamatória pela ativação do sistema imune (FLESHNER, 2013; PATIDAR et al., 2018; SRIKRISHNA; FREEZE, 2009).

Os DAMPs se ligam aos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR), onde temos os Receptores Toll-like (TLRs), encontrados na membrana plasmática e endossoma das células responsáveis pela apresentação de antígeno, temos o Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGEs), os Receptores de Interleucina-1 (IL1R1), os Receptores Nod-like (NLRs), onde podemos destacar o Receptor de Domínios de Oligonização e Nucleotídeo (NOD) e o Receptor Ausente no Melanoma-2 (AIM2). Esse processo tem como primeiro passo o estímulo da síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias (NAKAHIRA; HISATA; CHOI, 2015; SHAO et al., 2017; TURNER, 2016).

Novos estudos nos mostram que os DAMPs estão intimamente ligados na patogênese de doenças crônicas onde temos o câncer, cardiopatias, a diabetes, doenças neurodegenerativas, doenças periodontal, hepatopatias, obesidades e várias outras. Os principais exemplos de DAMPs que temos são as Proteínas S100, Proteínas de Choque Térmico (HSPs) (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, onde essas que ativam o sistema imune inato quando o mesmo está diante dos agentes nocivos. Os TLRs, os mais bem ilustrados, apresentam domínios conservados, o que permite uma análise computacional mais facilitada. O IL1R1 é ativado por duas isoformas especificamente da interleucina 1 que são elas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Os NLRs são proteínas citoplasmáticas que reconhecem DAMPs e participam e influenciam na montagem dos inflamossomos, como os AIM2. Os RAGEs são imunoglobulinas

(Ig), que tem como importante função realizar a ativação da resposta imune inata, onde se ligam ao mais diversos DAMPs. O inflamossoma mais bem estudado dentre todos os conhecidos é o NLRP3 que tem um papel importante na expansão da resposta inflamatória estéril (BONGARZONE et al., 2017; DIAS; MACTAVISCH; CRUZ, 2015; IWATA; OTA; DUMAN, 2013; TURNER, 2016).

Existe uma grande variabilidade de DAMPs e a relação deles com fatores ambientais estressantes, o fator fisiológico natural do organismo, como o processo de envelhecimento, na intrincada rede de resposta imunológica, torna-se essencial uma análise molecular desses componentes, onde podemos comparar suas estruturas, sua relação com inúmeras doenças, com objetivo de estabelecer diagnósticos padrões e/ou terapêuticos. No contexto criado, no âmbito da análise genética citada acima, uma importante ferramenta que pode ser usada para comprovação das questões em relação ao DAMPs é a bioinformática. A mesma é uma ferramenta de pesquisa multidisciplinar para analisar dados moleculares e bioquímicos (PROSDOCIMI, 2007a).

Nos anos 80 e utilização da bioinformática cresce de forma exponencial nos dias de hoje graças ao grande número de sequenciamentos onde são utilizados para avaliações *in silico* de dados biológicos utilizando algoritmos matemáticos. Para profissionais da saúde a bioinformática tem mostrado que é extremamente necessária pois oferece grandes descobertas e a existência de uma enorme evolução no meio da biomedicina, onde se mostra de vital importância ao progresso da ciência (ARAÚJO et al., 2008; CAO et al., 2018; POLAND et al., 2013; SORIA-GUERRA et al., 2015).

A identificação de marcadores específicos que proporcionem a montagem de ensaios biológicos, com a comprovação dos mecanismos moleculares implícitos em enfermidades, passa a ter grande relevância. Assim, com o auxílio da bioinformática, o presente trabalho contemplou diferentes DAMPs humanos e seus receptores, onde obteve-se suas sequências de aminoácidos, análises de similaridade, desenho de *primers*, predição de antigenicidade de epítomos, predição de energia livre para formação de estrutura secundária proteica. Os *primers* com 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 faz parte da primeira linha de defesa do organismo contra agentes agressores externos e o processo inflamatório agudo possui como características feridas e infecções reconhecidas por sinais cardinais da inflamação que são calor, rubor, edema, vermelhidão que foram descritos por Cornelius Celsus médico romano, no século I; e no século XIX em 1858 o quinto sinal cardinal foi adicionado à lista que é a perturbação da função onde é considerado como o único sinal universal de inflamação pelo médico polonês Rudolph Virchow(VAN LINTHOUT; TSCHÖPE, 2017).

A resposta imune inata ou natural pode ser iniciada por diferentes formas exógenas e endógenas. Na forma exógena ocorre o reconhecimento das estruturas moleculares dos micro organismos patogênicos e recebe o nome de padrões moleculares associados ao dano (PAMPs), já nas formas endógenas uma forma através do desequilíbrio que foi causado por uma agente externo e assim as bactérias presentes na flora intestinal passam a ser reconhecidas como algo ruim através dos padrões moleculares associados a microbiota comensal (MAMPs) e a segunda forma é através de moléculas produzidas ou liberadas por células danificadas ou estressadas que recebem o nome de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Tais padrões esses se ligam aos PRRs, que são expressos na membrana plasmática ou membrana endossomal e citoplasma de vários tipos celulares, que ativam mecanismos próprios de defesa. A resposta inflamatória ocorre então pela ativação do sistema imunológico, que convoca as células denominadas de leucócitos para a região lesionada, onde temos os neutrófilos, monócitos, células *Natural Killer* (NK) e células dendríticas (CD), que formam o sistema imune inato (FLESHNER, 2013; SRIKRISHNA; FREEZE, 2009).

DAMPs são moléculas intracelulares lançadas no meio extracelular após ocorrer uma lesão celular asséptica que pode ser causada por diversos mecanismos, sendo reconhecidas por PRRs, como o TLRs, RAGEs, IL1R1, NLRs onde podemos destacar o NOD e o AIM2. Tal ligação ativa o sistema imune inato, iniciando uma resposta inflamatória aguda, que é arranjado por citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1). É chamado de inflamação estéril pois se inicia após um trauma, isquemia, ou outro dano sem ação patogênica. No entanto, essa resposta pode evoluir e associar-se a várias complicações se ocorrer 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 formados por inúmeras famílias, que tem como função alertar o sistema imune inato sobre os agentes que são estranhos ou nocivos. Essas famílias são formadas pelos TLRs, compostos por domínios extracelulares, transmembranares e citoplasmáticos, onde essa é a família melhor caracterizada; os IL1R1 que reconhecem IL-1  $\alpha$  e IL-1  $\beta$ ; os NLRs, que é um conjunto de receptores intracelulares que se encontram no citosol; os receptores AIM2 e os RAGEs. São expressos principalmente em macrófagos, células dendríticas e entre outras células de defesa, capazes de dar início a 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) incentivando, 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)**

Toll-like são receptores que regulam o sistema imune inato. Eles têm a capacidade de reconhecer padrões como os PAMPs e os DAMPs, chegam a expressar 10 tipos de genes nos seres humanos onde cada um realiza uma função diferente na resposta imunológica. Temos os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 onde os mesmos são glicoproteínas transmembranares do tipo 1 que possuem motivos de repetição ricos em leucina, estes que tem como função ser mediador na ligação do ligante. Já os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são encontrados dentro das células em membranas lisossômicas e endossomais. Os TLRs conseguem identificar inúmeros sinais de perigo ou danos como peptídeos, proteínas, fragmentos de nucleotídeos, calor, oxidação, e vários outros sinais (DIAS; MACTAVISCH; CRUZ, 2015; GRISHMAN; WHITE; SAVANI, 2012).

Quando estimulados os TLRs passam a formar uma rede de sinalização homodiméricos ou heterodiméricos, onde estabelece-se, por exemplo, TLR1-TLR2 e TLR2-TLR6, ou com outro TLR idêntico como TLR3-TLR3. Para que a sinalização intracelular ocorra, ela é iniciada por proteínas pró inflamatórias adaptadoras. O único receptor que ativa mais de um canal de sinalização é o TLR4 que depende do mioloide88. Quando os TLR são ativados se inicia uma

casca de sinalização que envolve o recrutamento de outras proteínas adaptadoras pró-inflamatórias. Após a ativação dependente do receptor mieloide 88 da quinase 1/4 ativadora do receptor de IL-1 (IRAK-1/4), que começa com a ativação via mitógeno da proteína quinase (MAPK) e a translocação do NF- $\kappa$ Bp65 para o núcleo, este irá promover a ativação transcricional de genes que expressão em citocinas inflamatórias e quimiocinas, enquanto o caminho da MAPK induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, e também estimula a proliferação e sobrevivência celular(DIAS; MACTAVISCH; CRUZ, 2015; GRISHMAN; WHITE; SAVANI, 2012; TOLLE; STANDIFORD, 2013).

### **2.3. Substâncias que são reconhecidas como DAMPs**

#### **2.3.1 Proteínas S100**

É uma família de proteínas que possui alta solubilidade em sulfato de amônio saturado, são representadas por mais de 25 variações que se apresentam em várias células humanas onde cada um possui certa especificidade, a primeira vez que foi encontrada foi em um tecido nervoso em 1965. Cada proteína é lida por um gene separado e possui variações desde o S100A1 a S100A16, S100B, S100G, S100P, S100Z.É no cromossomo 1q21 que os genes estão localizados, porém a S100A11P está no cromossomo 7q22-q3, a S100B no cromossomo 21q22, S100P no cromossomo 4p16, S100G no cromossomo Xp22, S100Z no cromossomo 5q13. Todas apresentam semelhanças entre 20 a 60%, contudo cada família apresenta suas próprias particularidades (FEI et al., 2017a; RAFFAT et al., 2018; YANG et al., 2018).

As S100 se ligam nos RAGE, TLR4 via MyD88 e NLRP3, e pode-se associá-las a vários tipos de câncer, diabetes, doenças cardíacas, obesidade, doenças neurodegenerativas como Alzheimer, doenças pulmonares, e várias outras(AHMAD et al., 2018; SRIKRISHNA; FREEZE, 2009; TURNER, 2016; VAN LINTHOUT; TSCHÖPE, 2017).

A sua secreção se dá por vários meios entre eles temos a forma autócrina, endócrina e parácrina, o que leva a uma alta concentração da mesma, interferindo na sinalização celular variadas[24].De acordo com sua função as S100 foram divididas em subgrupos, as que tem função intracelulares são as S100, as S100A1 que exerce a função regulatória de cálcio e se encontra no músculo estriado onde temos o cardíaco e a S100B com função intracelular e extracelular onde ela na função intracelular interage com a proteína quinase e bloqueia a proteína NDR e na sua função extracelular ativa a proteína quinase que é regulada por NF- $\kappa$ B. Inúmeras funções são associadas a estas proteínas como 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).

Pertencem à família calgranulina, essa que é uma família que se liga ao cálcio, são caracterizadas por motivos de mão EF de ligação de cálcio. Formam homodímeros, heterodímeros e oligômeros. Apresentam 2 locais específicos de ligação ao cálcio, que possuem conformação tipo helix-loop-helix-mão, e se ligam por uma região de dobradiça, presente em todas as proteínas e é chamada de região C-terminal, e a região N-terminal exclusiva das proteínas S100. Tal região é responsável pela igualdade das sequências. Sua atividade é regulada por íons metálicos, como  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ . Não apresentam sinais secretórios necessários para o transporte dependente de Golgi, sua liberação ocorre por mecanismos que dependem 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, ativando 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, as S100 são liberadas e se ligam aos TLRs e RAGE e iniciam a resposta inflamatória através da sinalização em cascata. Quando ligadas ao RAGE, elas ativam NF- $\kappa$ B e incentivam 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 tem como função extracelular em vários tipos celulares entre eles os adipócitos, melanócitos, condrócitos, musculatura lisa arterial, células de Schwann, micróglia e astrócitos. 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 proteína S100A1 apresenta efeitos extracelulares deletérios e é muito encontrada em cardiomiócitos onde sua liberação ocorre após lesão isquêmica, causando efeitos antifibróticos entre eles a 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 a outros receptores como fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o receptor de IL-10. Está associada a inúmeras doenças como a fibrose tecidual, artrite reumatoide, psoríase, dano cerebral, doenças pulmonares como a DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) e PAH (Hipertensão Arterial Pulmonar), doenças autoimunes, contudo seu grande destaque está nas doenças cancerígenas. É uma proteína específica de fibroblastos e, por isso, 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 descritas como semelhantes à citocinas e fatores transcricionais, interferindo na expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 e metalo proteinases de matriz (RAFFAT et al., 2018).

O dímero formado S100A8/A9 favorece a transmigração de monócitos e neutrófilos, apoptose celular, autofagia em linfócitos, macrófagos, células endoteliais e células tumorais e formam a calpronectina (XIA et al., 2018), que é um mediador pró-inflamatório que pode ser liberado 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,auxiliana 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).

### 2.3.2 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 intermediárias parcialmente enoveladas, 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 alcance 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 SmallHSPs (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 com PM 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. 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 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).

As HSPs podem atuar como DAMPs quando liberados para o meio extracelular e estão relacionados à isquemia, doenças neurodegenerativas e câncer. 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. A HSPA90 é expressa cerca de 2 a 10 vezes mais em células cancerosas comparado às células normais, e este fato faz com que seja um poderoso alvo na terapia do câncer, pois seu bloqueio leva à degradação e estimula a morte tumoral através das células natural killer (NK) melhoradas (PENNISI; ASCENZI; DI MASI, 2015).

## **2.4 Bioinformática**

A bioinformática é uma linha de pesquisa de caráter que utiliza ferramentas computacionais para analisar dados bioquímicos e moleculares, onde combina técnicas e inovações científicas de diversas áreas como a ciência da computação, química, estatística e a biologia molecular. Tem por objetivo analisar uma grande quantidade de dados oriundos dos diversos métodos de sequenciamento de genomas, transcriptomas, proteomas, entre outros (PROSDOCIMI, 2007). Surgindo na década de 80, para ampliar as fronteiras do conhecimento pela análise e apresentação de dados biológicos de forma matemática, utilizando algoritmos computacionais. Com o avanço da tecnologia que se tornou acessível a um grande número de pessoas e a conscientização dentre os pesquisadores sobre ética em experimentação e bem estar animal, ela vem sendo muito utilizada e assim substituindo, o atual modelo de pesquisa. Esta mudança e progresso de recursos tecnológicos, têm sido prioritários para prover certas carências

no armazenamento e comparação de dados genômicos de natureza humana (ARAÚJO et al., 2008).

A bioinformática integra programas computacionais, para analisar dados e identificar sequências genômicas, prever estrutura tridimensional das proteínas, identificar enzimas inibidoras, proporcionar a aglomeração proteica, 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).

Estudos relacionados aos agentes tóxicos; epilepsia; e vários tipos de câncer, como melanoma cutâneo, câncer de mama, carcinoma hepático; também utilizam análises computacionais para esclarecer os mecanismos envolvidos nestas e outras patologias. Inovações tecnológicas fornecem dados genéticos 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 of Biochemistry & Biophysics from University of Rochester Medical Center, New York capaz de analisar sequências que apresentam até 4000 pb e, RNA fold Web Server 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 detecta 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). RNA fold Web Server 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).

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).

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.

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).

Utilizando a bioinformática, o presente trabalho teve como objetivo descobrir diferentes DAMPs humanos e seus receptores com potencial de determinar sequências alvos que poderão ser utilizados como alvos em ensaios de prognóstico de enfermidades ou ainda como moduladores na resposta imunológica.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho de conclusão faz parte de um trabalho maior de dissertação de mestrado intitulado “Avaliação *in silico* de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) e seus receptores em seres humanos de autoria da mestra em ciências da saúde Erika Oliveira Aparecida.”

#### **3.1 Sequência utilizadas**

Uma revisão bibliográfica foi feita, juntamente de uma 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 as proteínas S100, HSP e os receptores TLRs. Todos os dados obtidos foram pesquisados e analisados na plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Foi feita 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/nucore>).

### 3.2 Predição de mRNA Secundário

Através de softwares online, onde esses utilizam um algoritmo de energia livre mínima (MFE) foi feita a predição de mRNA secundário, que informa a menor energia livre para conformação espacial, para tal foi usado os softwares online RNA Structure 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) (<https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>); e o RNAfold WebServer desenvolvido pelo Institute for Theoretical Chemistry from University of Vienna, Austria (RNA fold WebServer), capaz de analisar sequências com até 5000 pb para previsões de energia livre mínima (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

### 3.3 Predição de Antigenicidade de Epítomos

A predição de antigenicidade de epítomos de todas as sequências encontradas foi realizada pelo Immune Epitope Database Analysis Resource. A ferramenta utilizada informa a predição de Epítomo de célula B, indicando 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.

### 3.4 Análise de similaridade com outros mamíferos

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

### 3.5 Desenho de marcadores

Os desenhos dos *primers* para identificação de biomarcadores foram realizados a partir das sequências de mRNA que ofereceram a melhor predição de estrutura secundária e o software utilizado foi o Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os padrões 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. As demais informações permaneceram as configuradas automaticamente. 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)).

## 4 RESULTADOS

Após levantamento bibliográfico, foi feita a escolha de sequências de aminoácidos (mRNA) dos DAMPs e de seus receptores usando a ferramenta nucleotídeo do NCBI gerando um total de 178 sequências, onde 24 sequências TLRs, 122 sequências HSP, e 32 sequências S100.

### 4.1 Predição de mRNA secundário

Foram 178 sequências onde 113 possuem até 4000 pb e foram submetidas ao software RNAstructure onde o mesmo consegue gerar 20 modelos de possíveis predições de energia livre para cada sequência, entre elas foram selecionadas a sequência que apresentava a menor energia livre. Quando a sequência apresentava mais de 4000pb, ou seja, as sequências restantes utilizaram-se outra ferramenta o RNA foldWebServer. As sequências que se destacaram com a menor energia livre (MFE) para os PRRs e DAMPs estão apresentadas nas Tabelas 1 a 9.

Tabela 1: TLR: Predição de energia livre mínima mRNA

<b>Receptor</b>	<b>Variante</b>	<b>MFE</b>
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

Legenda: TLR (Toll-like receptor), MFE (minimum free energy). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 2: HSP HIKESHI e HSP 10: Predição de energia livre mínima mRNA

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

Legenda: HIKESHI (heat shock protein nuclear import factor), HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 3: HSP 40: Predição de energia livre mínima mRNA (Continua)

<b>DAMPs</b>	<b>Família</b>	<b>Membro</b>	<b>Variante</b>	<b>MFE</b>
HSP40	DNAJ	A1	1	-666,9
			2	-613,6
				-858,8
			A3	-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
		2	-535,1
C8		1	-527,2
C9			-695,8
C11			-1227,3
C12		1	-315,1
		2	-219,7

Tabela 3: HSP 40: Predição de energia livre mínima mRNA (Conclusão)

DAMPs	Família	Membro	Variante	MFE
		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

Legenda: HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 4. HSP 60: Predição de energia livre mínima mRNA

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

Legenda: HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 5: HSP 70: Predição de energia livre mínima mRNA (Continua)

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		

Tabela 5: HSP 70: Predição de energia livre mínima mRNA (Conclusão)

DAMPs	Família	Membro	Variante	MFE	
		12B	1	-1431,2	
			2	-1429,5	
			3	-1386,4	
		13		-995,9	
			14	1	-563,0
				3	-1270,4

Legenda: HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 6: HSP 90: Predição de energia livre mínima mRNA

<b>DAMPs</b>	<b>Família</b>	<b>Membro</b>	<b>Variante</b>	<b>MFE</b>
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

Legenda: HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 7: HSP 110: Predição de energia livre mínima mRNA

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

Legenda: HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 8: HSP B: Predição de energia livre mínima mRNA

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

Legenda: HSP (heat shock protein), MFE (minimum free energy). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 9: S100: Predição de energia livre mínima mRNA

<b>DAMPs</b>	<b>Membro</b>	<b>Variante</b>	<b>MFE</b>
S100	A1		-206,9
			-369,7
	A2	1	-252,7
		2	-356,2
		3	-282,7
	A3		-163,4
	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

Legenda: S100 (S100 protein), MFE (minimumfreeenergy). Fonte: Do autor (2019).

## 4.2 Predição de Antigenicidade de Epítomos

Todas as 226 sequências obtidas passaram pela análise de predição de antigenicidade de epítomos onde foram selecionadas aquelas que possuíam maior valor. As TABELAS 10 a 15 mostram os resultados da predição de antigenicidade, mostrando a posição do resíduo<sup>1</sup> dentro do peptídeo. Cada um desses resíduos foi 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 TLR2, 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

<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).

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, HSP40A3, HSP40B1, HSP40C6, HSP40C7, HSP7012A, HSP7012B, HSP90AA1, HSP90AB1, as variantes 1 a 5 da HSP40B4, as variantes 1 e 2 da HSP40B14, as variantes 1, 2, 3 e 5 da HSP110 e as variantes 2, 3, 4, 6, 7 e 8 da HSPB7. As sequências que foram diferentes no quesito resíduo, peptídeo e score foram as proteínas HSP40A1, HSP40B2, HSP40C16, HSP40C19, HSP704LIKE, 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.

Tabela 10: TLR: Predição de antigenicidade de epítomos

Receptor	Variante	Posição	Resíduo	Peptídeo	Score
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	VILIFL	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

Legenda: TLR (Toll-like receptor). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 11: HMGB1, HIKESHI, HSPs 10 e 60: Predição de antigenicidade de epítomos

DAMPs	Variante	Posição	Resíduo	Peptídeo	Score
HSP 10		44	A	VLQATVV	1.198
HSP 60	1 e 2	445	L	CALLRCI	1.202

Legenda: HSP (heat shock protein). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 12: 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	VCVVHCL	1.333
		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	

Tabela 12: HSP 40: Predição de antigenicidade de epítomos (Conclusão)

DAMPs	Membro	Variante	Posição	Resíduo	Peptídeo	Score
	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	LIVLVI	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	VLLVAAV	1.254
C24		114	S	FYLSCRC	1.173
C25	1	154	V	VILVSVC	1.282
C27	1 e 2	130	V	IIFVCA	1.234
C28	1 a 3	104	S	KVLSHVI	1.174
C30		98	Y	SQAYVVL	1.881

Legenda: HSP (heat shock protein). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 13: HSP 70: Predição de antigenicidade de epítomos

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
			241	V	AYQVLVC	1.238
			184	V	AYQVLVC	1.238
			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
			58	V	FLVVAV	1.277
	12B	1	513	P	VVPHDV	1.224
			512	P	VVPHDV	1.224
			427	P	VVPHDV	1.224
	13		221	V	VFHVLI	1.250
	14	1 e 3	15	V	SACVAVY	1.211

Legenda: HSP (heat shock protein). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 14: 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	145	S	CVISVPS	1.203
		4	145	S	CVISVLG	1.209
HSP B	1		8	S	RVPFSL	1.132
	2		163	S	VYISLLP	1.182
	3		132	V	LSAVLCH	1.211
	6		77	L	FSVLLDV	1.176
	7	1	36	Q	SHCQVLW	1.153
		2	125	K	FAHKCQL	1.124
		3	129	K	FAHKCQL	1.124
		4	119	K	FAHKCQL	1.124
		5	115	P	CQLPEDV	1.120
		6	120	K	FAHKCQL	1.124
		7	124	K	FAHKCQL	1.124
		8	130	K	FAHKCQL	1.124
	8		101	N	VCVNVHS	1.208
	9		134	L	CVALALP	1.212
	11	1 e 2	66	S	VIQSYFV	1.171

Legenda: HSP (heat shock protein). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 15. 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

Legenda: S100 (protein S100).Fonte: Do autor (2019).

### 4.3 Análise de similaridade

Os resultados da análise de similaridade entre as sequências humanas e mamíferos estão apresentados nas TABELAS 16 a 22, onde foi possível determinar que algumas sequências de nucleotídeos são exclusivas para o *Homo sapiens*. Dentre os PRRs, as sequências que são

exclusivas em humanos são o TLR 1, as variantes 1 a 6 do TLR2, as variantes 1, 3 e 4 do TLR4, TLR5, TLR6, TLR10. A exclusividade nas sequências de DAMPs são as 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.

Tabela 16: TLR: Análise de similaridade com sequências de humanos

Receptor	Variante	Espécie (NM, mRNA)	Identidade		
TLR 1		Exclusivo			
TLR 2	1 a 6	Exclusivo			
	7 e 8	<i>Cercocebusatys</i>		97%	
		<i>Gorilla gorilla</i>			
		<i>Pan paniscus</i>	99%	99%	99%
		<i>Pan troglodytes</i>			
TLR 3		<i>Cercocebusatys</i>			
		<i>Macaca fascicularis</i>	97%	97%	97%
		<i>Macaca mulatta</i>			
TLR 4	1, 3 e 4	Exclusivo			
TLR 5		Exclusivo			
TLR 6		Exclusivo			
		<i>Pan troglodytes</i>		99%	
TLR 7		<i>Macaca mulatta</i>			
		<i>Macaca fascicularis</i>	96%	96%	
TLR 8	1 e 2	<i>Pan troglodytes</i>		99%	
TLR 9		<i>Pan troglodytes</i> twinfilin actin binding protein 2 (TWF2)		99%	
TLR 10	1 a 5	Exclusivo			

Legenda: TLR (Toll-like receptor). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 17: HIKESHI e HSP: Análise de similaridade com sequências de humanos

DAMPs	Família	Membro	Variante	Espécie(NM, mRNA)	Identidade
HSP HIKESHI			1 e 5	<i>Pan troglodytes</i>	99%
				<i>Macaca mulatta</i>	98%
			6 e 7	<i>Pan troglodytes</i>	99%

				<i>Bostaurus</i>	94%
HSP 10	HSPE	1		<i>Macaca mulatta</i>	96%

Legenda: HIKESHI (heat shock protein nuclear import factor), HSP (heat shock protein).

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 18: HSP 40: Análise de similaridade com sequências de humanos (Continua)

DAMPs	Família	Membro	Variante	Espécie (NM, mRNA)	Identidade		
HSP40	DNAJ	A1	1	<i>Pan troglodytes</i>	99%		
				<i>Macaca fascicularis</i>	98%		
						<i>Pongoabelii</i>	98%
				2	<i>Pan troglodytes</i>	99%	
			A2		<i>Macaca fascicularis</i>	99%	
			A3	1 a 3	Exclusivo	100%	
			B1	1 a 3	Exclusivo	100%	
			B2	1	<i>Pan troglodytes</i>	99%	
		<i>Macaca fascicularis</i>			97%		
					<i>Macacamulatta</i>	97%	
					<i>Bostaurus</i>	85%	
				2	<i>Pan troglodytes</i>	99%	
			B4	1	<i>Pongo abelii</i>	99%	
		<i>PongoabeliiDKFZP459E0515 protein</i>			99%		
					<i>Macaca fascicularis</i>	98%	
					<i>Macacamulatta</i>	98%	
				2	<i>Pongo abelii</i>	99%	
					<i>PongoabeliiDKFZP459E0515 protein</i>	99%	
					<i>Macaca fascicularis</i>	98%	
					<i>Macacamulatta</i>	98%	
					<i>Pongo abelii</i>	99%	
				3	<i>PongoabelliiDKFZP459E0515 protein</i>	99%	
					<i>Macaca mulatta</i>	98%	
					<i>Macaca fascicularis</i>	97%	
				4	<i>Pongo abelii</i>	99%	
					<i>Pongo abelii</i>	98%	
					<i>Macaca mulatta</i>	98%	
					<i>Macaca fascicularis</i>	97%	
		5	<i>Pongo abelii</i>	99%			
			<i>PongoabeliiDKFZP459E0515 protein</i>	99%			

Tabela 18: HSP 40: Análise de similaridade com sequências de humanos (Continua)

DAMPs	Família	Membro	Variante	Espécie (NM, mRNA)	Identidade
				<i>Macaca mulatta</i>	98%
				<i>Macaca fascicularis</i>	97%
				<i>Pongo abelii</i>	98%
			6	<i>PongoabeliiDKFZP459E0515 protein</i>	98%
				<i>Macaca fascicularis</i>	97%

			<i>Macacamulatta</i>	97%
B6	1		<i>Pongo abelii</i>	99%
			<i>Macaca mulatta</i>	95%
	2		<i>Pongo abelii</i>	99%
			<i>Bostaurus</i>	87%
			<i>Mus musculus</i> , transcript variant 3 e 4	85%
	4		<i>Pongo abelii</i>	99%
			<i>Macaca mulatta</i>	93%
B9			<i>Pan troglodytes</i>	99%
			<i>Pongo abelii</i>	97%
			<i>Macaca fascicularis</i>	95%
B11			<i>Sus scrofa</i>	91%
			<i>Bostaurus</i>	90%
B14	1		<i>Pongo abelii</i>	98%
			<i>Macacafascicularis</i>	98%
	2		<i>Pongo abelii</i>	98%
			<i>Macacafascicularis</i>	98%
	3		<i>Pongo abelii</i>	99%
			<i>Macaca fascicularis</i>	98%
C1			<i>Macaca mulatta</i>	96%
			<i>Mus musculus</i>	85%
C2	1		<i>Pan troglodytes</i>	99%
			<i>Macaca fascicularis</i>	98%
			<i>Macacamulatta</i>	98%
			<i>Bostaurus</i>	94%
	2 e 3		<i>Pan troglodytes</i>	99%
			<i>Macaca fascicularis</i>	98%
			<i>Macacamulatta</i>	98%
C3			<i>Macaca mulatta</i>	95%
C5			<i>Macaca mulatta</i>	92%
			<i>Mus musculus</i>	85%
C5B	1 e 2		<i>Pan troglodytes</i>	99%
C5G	1 a 3		<i>Pan troglodytes</i>	98%
C6	1 e 3		Exclusivo	
C7	1		<i>Pongo abelii</i>	99%
			<i>Macacafascicularis</i>	99%

Tabela 18: HSP 40: Análise de similaridade com sequências de humanos (Conclusão)

DAMPs	Família	Membro	Variante	Espécie (NM, mRNA)	Identidade
				<i>Macacamulatta</i>	99%
				<i>Bostaurus</i>	93%
			2	<i>Pongo abelii</i>	99%
				<i>Macacafascicularis</i>	99%
				<i>Macacamulatta</i>	99%
C8			1	<i>Pan troglodytes</i>	99%

			<i>Macaca mulatta</i>	97%
C9			<i>Bostaurus</i>	88%
C11			<i>Pongo abelii</i>	97%
C12	1		<i>Bostaurus</i>	83%
	2		<i>Bostaurus</i>	88%
C15			<i>Pongo abelii</i>	96%
C16	1 e 2		<i>Pongo abelii</i>	98%
C17			<i>Macaca fascicularis</i>	96%
			<i>Bostaurus</i>	89%
C18			<i>Bostaurus</i>	85%
C19	1 e 2		<i>Macaca mulatta</i>	99%
			<i>Pongo abelii</i>	97%
C21	1 e 3		Exclusivo	
	2		<i>Bostaurus</i>	88%
C22	1 e 2		<i>Pongo abelii</i>	98%
			<i>Macaca mulatta</i>	96%
C24			<i>Macaca mulatta</i>	95%
C25	1		<i>Pan troglodytes</i>	99%
			<i>Pongo abelii</i>	98%
			<i>Macaca mulatta</i>	96%
			<i>Callithrix jacchus</i>	93%
			<i>Bostaurus</i>	90%
			<i>Canis lupus familiaris</i>	89%
			<i>Oryctolagus cuniculus</i>	87%
C27	1		<i>Macaca mulatta</i>	97%
			<i>Pongo abelii</i>	97%
			<i>Bostaurus</i>	84%
	2		<i>Pongo abelii</i>	97%
			<i>Macaca mulatta</i>	95%
C28	1 e 2		<i>Pongo abelii</i>	98%
			<i>Papio anubis</i>	97%
			<i>Macaca fascicularis</i>	96%
	3		<i>Pongo abelii</i>	97%
			<i>Papio anubis</i>	97%
			<i>Macaca fascicularis</i>	96%
C30			<i>Macaca fascicularis</i>	93%
			<i>Macaca mulatta</i>	93%
			<i>Bostaurus</i>	78%

Legenda: HSP (heat shock protein), NM (nucleotide). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 19: HSP 60 e 70: Análise de similaridade com sequências em seres humanos

DAMPs	Família	Membro	Variante	Espécie(NM, mRNA)	Identidade
HSP 60	HSPD	1	1 e 2	<i>Pantroglodytes</i>	99%
				<i>Pongo abelii</i>	99%

HSP 70	HSPA	1A		<i>Macaca mulatta</i>	98%	
				<i>Pan troglodytes</i>	98%	
				<i>Pongo abelii</i>	97%	
				<i>Macaca fascicularis</i>	96%	
		1B		<i>Pantroglodytes</i>	98%	
				<i>Pongo abelii</i>	98%	
				<i>Macaca fascicularis</i>	97%	
		1 LIKE		<i>Macaca fascicularis</i>	97%	
			2		<i>Pan troglodytes</i>	99%
		4		<i>Pongo abelii</i>	98%	
				<i>Bostaurus</i>	89%	
		4 LIKE	1 a 4		Exclusivo	
				5	<i>Pongo abelii</i>	98%
				<i>Macaca mulatta</i>	97%	
				<i>Ictidomystridecemlineatus</i>	94%	
				<i>Bostaurus</i>	93%	
		6		<i>Sus scrofa</i>	89%	
		8	1 e 2	<i>Pongo abelii</i>	99%	
				<i>Macaca mulatta</i>	97%	
		9		<i>Pongo abelii</i>	99%	
12A	1 e 2		Exclusivo			
12B	1 a 3		Exclusivo			
13		<i>Pongo abelii</i>	97%			
		<i>Macaca mulatta</i>	96%			
		<i>Bostaurus</i>	87%			
14	1	<i>Pan troglodytes</i>	99%			
		<i>Macaca fascicularis</i>	98%			
		<i>Macacamulatta</i>	98%			
		<i>Sus scrofa</i>	90%			
		3	<i>Pan troglodytes</i>	99%		

Legenda: HSP (heat shock protein).Fonte: Do autor (2019).

Tabela 20: HSP 90: Análise de similaridade com sequências de humanos

DAMPs	Família	Membro	Variante	Espécie (NM, mRNA)	Identidade
HSP 90	AA	1	1 e 2	<i>Pan troglodytes</i>	99%
				<i>Macaca fascicularis</i>	96%

				<i>Macacamulatta</i>	96%
				<i>Equuscaballus</i>	87%
			2	<i>Bostaurus</i>	86%
AB	1	1 e 2		<i>Pan troglodytes</i>	98%
				<i>Pongoabelii</i>	98%
				<i>Macaca mulatta</i>	97%
			3 a 5	<i>Pan troglodytes</i>	99%
				<i>Pongoabelii</i>	99%
				<i>Macaca mulatta</i>	98%
B	1			<i>Pan troglodytes</i>	99%
				<i>Pongoabelii</i>	99%
				<i>Macaca fascicularis</i>	98%
				<i>Macacamulatta</i>	98%
				<i>Equuscaballus</i>	94%
				<i>Sus scrofa</i>	93%
				<i>Canis lupusfamiliaris</i>	92%

Legenda: Legenda: HSP ( heat shock protein). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 21: HSP 110 e B: Análise de similaridade com sequências de humanos

DAMPs	Família	Membro	Variante	Espécie(NM, mRNA)	Identidade
HSP 110	H	1	1 a 5	<i>Pongo abelii</i>	99%
HSP	B	1		<i>Macaca fascicularis</i>	96%
				<i>Macacamulatta</i>	96%
				<i>Ailuropodamelanoleuca</i>	89%
				<i>Sus scrofa</i>	89%
				<i>Canis lupusfamiliaris</i>	86%
		2		<i>Macaca mulatta</i>	98%
		3		Exclusivo	
		6		<i>Macaca fascicularis</i>	95%
				<i>Macacamulatta</i>	95%
				<i>Bostaurus</i>	78%
		7	1 a 8	Exclusivo	
		8		<i>Pongo abelii</i>	99%
				<i>Pongo abelii</i> DKFZP468M2420 protein	97%
				<i>Macaca mulatta</i>	94%
				<i>Bostaurus</i>	84%
		9		Exclusivo	
		11	1 e 2	<i>Macaca mulatta</i>	97%

Legenda: HSP ( heat shock protein), NM (nucleotide). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 22: S100: Análise de similaridade com sequências de humanos

DAMPS	Membro	Variante	Espécie (NM, mRNA)	Identidade
S100	A1		<i>Pongo abelii</i>	98%
			<i>Macaca fascicularis</i>	97%

A2	1 a 3	Exclusivo	
A3		Exclusivo	
A4	1	Exclusivo	
	2	<i>Bostaurus</i>	87%
A5		Exclusivo	
A6		<i>Macaca mulata</i>	97%
A7		Exclusivo	
A7A		Exclusivo	
A8	1 a 5	<i>Macaca mulata</i>	94%
A9		<i>Bostaurus</i>	83%
		<i>Oryctolagus cuniculus</i>	79%
		<i>Sus scrofa</i>	76%
A10		<i>Macaca mulata</i> transcriptvariant 2	97%
		<i>Macaca mulata</i> transcriptvariant 1	96%
A11		<i>Macaca mulata</i>	94%
A12		Exclusivo	
A13	1 a 5	Exclusivo	
A16	1 e 2	Exclusivo	
	3	<i>Sus scrofa</i>	81%
B		<i>Macaca mulata</i>	96%
		<i>Macaca fascicularis</i>	95%
G		<i>Equus caballus</i>	88%
		<i>Bostaurus</i>	84%
P		Exclusivo	
Z		Exclusivo	

---

Legenda: S100 (protein S100), NM (nucleotide). Fonte: Do autor (2019).

#### 4.4 Desenho de iniciadores

Ao considerar as sequencias dos resultados anteriores, os desenhos dos iniciadores foram feitos para amplificação de possíveis candidatos a marcadores moleculares, onde foram 20 pares de primers para os receptores e 74 pares de primers para DAMPs, que foram apresentados nas TABELAS 23 a 26. Para o receptor TLR6 e para os DAMPs HSP40C30, HSP70 1A, HSP70 1B, HSP70 2, HSP70 6, HSPB3 e HSPB9 não foram encontrados *primers*, portanto não puderam ser desenhados para os modelos de PCR submetidos. Os *primers* desenhados para as sequências de HSP40C9 e HSP70 8 não atenderam ao requisito composição GC pré-estabelecido na metodologia.

Tabela 23: Receptores TLR 1-10: Desenho de *Primer*

<b>Receptor</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>ProductLenght</b>
TLR 1	CCAAATGGAACAGACAAGCAGG	ATGAAGACCCTGGCCACAAA	116
TLR2	AGGTGACTGCTCGGAGTT	TCCAGTGCTTCAACCTTCAC	111
TLR3	CGAGAGTGCCGTCTATTTGC	CATGATTCTGTTGGATGACTGC	98
TLR4	ATGCCAGGATGATGTCTGCC	GGATTTCACACCTCCACGCA	112
TLR5	AGTCACCAAACCAGGGATGC	CTGAGGCTCCGACATCTTCC	147
TLR6	*	*	
TLR7	TCAAGAAAGTTGATGCTATTGGGC	GTGTCCACATTGGAAACACCAT	129
TLR8	AGTTTCTCTTCTCGGCCACC	GGAACATGTTTTCCATGTTTCTGT	103
TLR9	CCAGCATGGGTTTCTGCCG	TCACAGGGTAGGAAGGCAGG	112
TLR10	AGCCAATTCTGACCGTGTCAAC	ATGAAGATGAGCTCAAACCCCCA	90

Legenda: \* *Primer não desenhado*. Fonte: Do autor (2019).

Tabela 24: HMGB1 e HSP: Desenho de *Primer*(Continua)

<b>Receptor</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>ProductLenght</b>
HSP10	TCGGGTTCTAAAGGAAAGGGTG	TTTGGTGCCTCCATATTCTGGG	90
HSP40A1	GAAGGAGAGAAGGTAAAAATGTTGT	AGCACTCTACTGCTCCTTTCT	150
HSP40A2	GTAGTGCATGCAGTGGCCAAG	CTGTTGTACCATCCCTGGAGC	116
HSP40A3	GGTGTGAGCCTTACAGGAAGAT	TGAACTCCTTGTTGACCCCC	141
HSP40B1	GGAAACCAAGGTAAGCGACG	CTCAGGGGCAGGATCTCAGAA	125
HSP40B2	ACCCGCAGATGTGTTCTGAG	GGCTCTACACTCAGCATGGG	132
HSP40B4	TGGGGAGGAAGGCATTGTGTG	CTTCTCCTCATTCCGGGTTTCAC	106

Tabela 24: HMGB1 e HSP: Desenho de *Primer*(Continua)

<b>Receptor</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>ProductLenght</b>
HSP40B6	ACAAAGAGAATTGTCGAGAACGG	TCTGTTAAGTGCGTGCGTTG	136
HSP40B9	GAGATTAGGGTGC GTGCCAG	CTAATATCCTGCACCCTCCGAC	138
HSP40B11	GCTGTGAGGAGTGTGTGGAA	AATCTCGTCCGGCAATCACC	118
HSP40B14	GCACAAAGGACAGCACATCT	ATCACTCTTGTGTGTTAGGTACAG	140
HSP40C1	CCCACGAATTGGGTCGATCT	GTCTAACCATTCTGGGGAGC	90
HSP40C2	TGACCTCTGCCTCTACTCT	CTCCAGTTCCTGAAAAGAGGCA	107
HSP40C3	CCACACACCTTTCCTCCTCT	CTCCACATTCAGCACCTTCG	137
HSP40C5	GCGCTCACTGTCTACCTCTG	GGCAAGCTTCCGATAGGACT	100
HSP40C5B	CAAGGGAACATACAGATAACGGC	TGGTTATCCCTCTTGGTGTTAGA	94
HSP40C5G	ATCCTACAGACTTGTTCATCC	GGAGGCTGACTCTGGACATT	146
HSP40C6	GACCGCTGACTGTGAATGAC	GAGATGAGGCACCTTTATTTTCAG	125
HSP40C7	AGCTGAGGCATGGCCTTGTT	AAAGTCTCTGCTTCCCTCGCA	109
HSP40C8	AGACTGACCCGTCCTGGTT	ACCAAGATGGATAACTGCCGAA	120
HSP40C9	**	**	
HSP40C11	AATGGAAGGATGGGAGGTTGTG	CTTGGGATTGGTTCGCTGCT	118
HSP40C12	TCCGAGGGAAGAAGGACTGA	GCCAGGATTTGTTCAACCGAAG	128
HSP40C15	GCTCCAGTTGGCGAGAGTTT	GCGTAGCGACCTGCAAATG	149
HSP40C16	ACTTTCCCGGCATCCTGACAA	TCTGGTAGCCCTGGTTCTCTC	149
HSP40C17	GTAGTACGAATCCGTCAGGC	GCCTTCTTTACCTCTTTGTCCG	116

Tabela 24: HMGB1 e HSP: Desenho de *Primer*(Conclusão)

<b>Receptor</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>ProductLenght</b>
HSP40C18	CCTTCTCTTTCAGCCTCGGG	ATGTAAGCTTCCGTCCAGCG	107
HSP40C19	TCACACTCACCAGGACACAA	GTACTGGCCTTACAGGAGTTC	143
HSP40C21	GCTGAACCACAAACAATGAGTG	TGCATGACCTGTGGCCTTTA	105
HSP40C22	CCGTGGATGTCTCTGCCTTA	CCTATCTGTAGTGCTCAAGCTG	104
HSP40C24	AAGTTAGCTAATCTGAGAAGGCC	TCTGCTCCCAGGATGCTGTA	96
HSP40C25	GCCTACGAGACACTCAAGGATG	ACATCCACCTTAGGGGCAA	125
HSP40C27	TGAGATGTTCCAGGGATGAAGTC	CTTCACTGCCAGGTGCTACA	90
HSP40C28	ATTGTCCGTTTTCTGGTCA	CACTGTAGCCTTTATCAGGTGAG	110
HSP40C30	*	*	

Legenda: HSP (heatshockprotein), \* *Primer* não desenhado, \*\* *Primer* desenhado não atendeu aos requisitos da metodologia. Fonte: Do autor (2019).

Tabela 25: HSP: Desenho de *Primer*(Continua)

<b>HSP</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>ProductLenght</b>
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

Tabela 25: HSP: Desenho de *Primer*(Conclusão)

HSP	Forward Primer	Reverse Primer	ProductLength
HSP70 5	ACCGCTGAGGCTTATTTGGG	CTGCCGTAGGCTCGTTGATG	148
HSP70 6	*	*	
HSP70 8	**	**	
HSP70 9	TAGGATGCCCAAGGTTTCAGC	AACACACCTCCCTGAATGGC	114
HSP70 12 <sup>a</sup>	GGACAGAGACCCGCACG	GATGTGGGAGCCGTTTCTCG	124
HSP70 12B	TACATCGAAACCCGAGGTCC	GCATAGCCACTAGACGTGGT	90
HSP70 13	ACCCGAGCAATGTCTGGAAC	GGGCACGAAGCCATATGTTTG	105
HSP70 14	GGCAGAAGCTCCAGTGATCC	TCTGGCAACATCTTCTGGGT	141
HSP90AA1	CCGTCGCTATATAAGGCAGGC	GGTTTCCTCAGGCATCTTGGC	111
HSP90AB1	GCTGAAAATTGACATCTCCATGA	GTGAAGGAACCTCCAGCAGA	144
HSP90B1	CCAGCACATCTGGGAGTCTG	GACAAGGGTAATTGTCGTTCCC	94
HSP110 1	TGTGGAGCAGATAACAGCCA	TGTTCCCAGTACTGAAATAACACA	103
HSPB1	GAGATCACCGGCAAGCACGA	AGGAAACTTGGGTGGGGTCC	109
HSPB2	CTGCATCTGCAGCCATGTCTG	CAGGAGGCCTTCTCCGAAGC	116
HSPB3	*	*	
HSPB6	TTTCGGTGCTGCTAGACGTG	GAATCCGTGCTCATCCGGG	116
HSPB7	AGAGGCCCTTAACTGCAACC	ATGGGCGGGTCCCTTGC	91
HSPB8	GCCAGAGGAGTTGATGGTGAA	CTCTGCAGGAAGCTGGATTTTC	127
HSPB9	*	*	
HSPB11	GTTTGGAACCTCGCAGAGGTTA	CAGGTGGGTGTTTTTCATCACT	114

Legenda: HSP (heatshockprotein), \* *Primer* não desenhado, \*\* *Primer* desenhado não atendeu aos requisitos da metodologia. Fonte: Do autor (2019).

Tabela 26: S100: Desenho de *Primer*

<b>S100</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>ProductLenght</b>
S100A1	CTTCCTGGATGCCCAGAAGGATG	GTTACAGGCCACTGTGAGAGC	130
S100A2	AGAGGGCGACAAGTTCAAGC	GGTCTCTGGAATGCCCCAC	90
S100A3	GGCGCTGTGGGGACAAATA	CCCGAAACTCAGTCGGGGTC	93
S100A4	TCTTGGTTTGATCCTGACTGCT	TCACCCTCTTTGCCCGAGTA	99
S100A5	GTTTCTGGGATTGGGGACGTG	TTTCCCTGATCTCTGTCCCTTCC	90
S100A6	CTCCCTACCGCTCCAAGC	CCGGAGTACTTGTGGAAGATGG	93
S100A7	AGTGCCTGTGACAAAAAGGG	TGCTCCATGGCTCTGCT	147
S100A7A	GTGCCTGTGACAAAAAGGGC	CGCTCCATGGCTCTGCT	146
S100A8	CATCAGCTGTAATGTGGGGCAA	ATCCCTGTAGACGGCATGGAA	131
S100A9	TCGGCTTTGACAGAGTGCAA	GCCCCAGCTTCACAGAGTAT	106
S100A10	GCCGCACGTACTAAGGAAGG	GTGGTCCGTTGAAGCCTTGG	115
S100A11	GTCCCTGATTGCTGTCTTCCA	GGGTCCTTCTGGTTCCTTGTG	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

Legenda: S100 (protein S100). Fonte: Do autor (2019).

#### 4.5 Validação

A validação de *primers* fornece a temperatura de *melting* e a temperatura de anelamento como apresentado nas TABELAS 27 a 30. As Temperaturas de *melting* do TLR10, das HSP40A2, HSP40B4, HSP40C7, HSPB1, HSPB2, S100A1, S100A3, S100A16 e S100P extrapolaram o limitemáximo que foi determinado na metodologia, e a HSP40C9 apresenta conteúdo GC acima de 70%. Todos os outros primers foram validados pela calculadora TmCalculator da Thermo Fisher Scientific.

Tabela 27: Validação *primers* de receptores

Receptor	%GC F/R	Tm F/R	Ta (°C)
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
TLR10	50/45	62,8/64,1	66,2

Legenda: %GC F/R (percentagem GC forward/reverse), Tm (MeltingTemperature), Ta (AnnealingTemperature). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 28: Validação *primers* HMGB1, HSP10 e HSP40 (Continua)

HMGB1 e HSP	%GC F/R	Tm	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
HSP40A2	57/57	63,6/62,0	65,5
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
HSP40B4	57/52	64,5/62,5	66,0
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

Tabela 29: Validação *primers* HMGB1, HSP10 e HSP40 (Conclusão)

<b>HMGB1 e HSP</b>	<b>%GC F/R</b>	<b>Tm</b>	<b>Ta (°C)</b>
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
HSP40C7	55/52	64,5/63,5	66,8
HSP40C8	55/45	62,3/61,4	64,5
HSP40C9	73/52	62,0/62,0	65,5
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

Legenda: HMGB1( High Mobility Group Box 1),HSP (Heat Shock Protein),%GC F/R (percentagem GC forward/reverse), Tm (Melting Temperature),Ta (Annealing Temperature).Fonte: Do autor (2019).

Tabela 30: Validação *primers* HSP60, HSP70, HSP90, HSP110 e HSPB (Continua)

<b>HSP</b>	<b>%GC F/R</b>	<b>Tm</b>	<b>Ta (°C)</b>
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
	57/57	62,1/63,2	65,5

Tabela 29: Validação primers HSP60, HSP70, HSP90, HSP110 e HSPB (Conclusão)

<b>HSP</b>	<b>%GC F/R</b>	<b>Tm</b>	<b>Ta (°C)</b>
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
HSPB1	60/60	64,4/63,9	67,3
HSPB2	60/65	63,4/64,3	66,8
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

Legenda: HSP (Heat Shock Protein), %GC F/R (percentagem GC forward/reverse), Tm (Melting Temperature), Ta (Annealing Temperature). Fonte: Do autor (2019).

Tabela 31: Validação primers S100

<b>S100</b>	<b>%GC F/R</b>	<b>Tm</b>	<b>Ta (°C)</b>
S100A1	56/57	64,5/62,4	65,8
S100A2	55/60	62,2/62,5	65,7
S100A3	60/65	62,2/64,1	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
S100A16	60/60	64,1/62,5	65,9
S100B	52/52	59,6/61,3	63,2
S100G	54/50	62,9/61,9	65,4
S100P	57/55	64,1/63,2	66,6
S100Z	55/55	61,8/61,2	64,7

Legenda: S100 (S100 Protein), %GC F/R (percentagem GC forward/reverse), Tm (Melting Temperature), Ta (Annealing Temperature). Fonte: Do autor (2019).

## 5 DISCUSSÃO

Ao avaliar os DAMPs e seus receptores pelo ponto de vista molecular foi possível permitir a seleção de marcadores que irão permitir a montagem de ensaios biológicos. Foram determinadas sequências de DAMPs e seus receptores, que mostram um grande potencial para serem testado no futuro em ensaios para a determinação de patogenicias ou moduladores d resposta imune. Quando se pensa em um marcador molecular espera-se uma característica objetiva medida e avaliada como um indicador de um processo biológico normal, patogênico ou farmacológico a uma intervenção terapêutica. A vantagem no uso de marcadores moleculares está na grande capacidade de diagnosticar um tratamento e prognóstico de doenças sem a necessidade de interação com o tecido ou órgão, onde é possível se usar um fluido corporal que é fácil de se obter (WADSWORTH S, SIN D, DORSCHIED D 2011)

Uma predição de mRNA foi feita e conseguimos verificar a estabilidade proteica das sequências baseado em sua energia livre. A análise de energia livre mínima (MFE) mostrou a menor energia para cada sequência mRNA, com isso pode-se supor que a estrutura conformacional da molécula terá uma proteína prevista estável (XU ZZ, MATHEWS DH.2016; LU ZJ, GLOOR JW, MATHEWS DH 2009; MATHEWS DH, DISNEY MD, CHILDS JL, SCHROEDER SJ, ZUKER M, TURNER DH. 2004).

Nas TABELAS 23 a 26 estão os desenhos dos primers, que foram realizados considerando as sequências que fornecera a melhor de estrutura secundária e conferiu maior estabilidade à proteína. Os primers típicos apresentam de 16 a 28 nucleotídeos de comprimento(CHUANG L-Y & CHENG Y-H & YANG C-H. 2013), apresentar uma composição GC de 30% a 70% onde a composição considerada ótima é de 50%(RASIT OZTURK A & CAN T. 2017), ter uma distribuição equilibrada dos domínios G/C e A/T e podem apresentar sequência de bases idênticas consecutivas de até 6 bases contínuas (IVÁDY G & MADAR L & DZSUDZSÁK E, ET AL 2018). Os *primers*, desenhados, por meio da qPCR, poderão ser utilizados em ensaios quantitativos, pois a expressão dos mesmos está altamente ligada ao diagnóstico, tratamento e prognóstico de enfermidades. Para validar os primers foi utilizada a calculadora TmCalculator da Thermo Fisher Scientific também o conteúdo GC, temperatura de melting e temperatura de anelamento que foram apresentados estão apresentados nas TABELAS 27 a 30.

A ativação inconsequente de TLRs pode começar respostas inflamatórias rigorosas e pode provocar diversos distúrbios patológicos entre elas as doenças autoimunes e neurodegenerativas (CHEN J-Q, SZODORAY P, ZEHER M.2018), asma, doença inflamatória

intestinal, artrite reumatoide, diabetes tipo 1 (GRISHMAN EK, WHITE PC, SAVANI RC. 2017), mas ao mesmo tempo pode exercer o papel de indicativo de proteção contra algumas doenças como de câncer de pulmão, onde notamos a grande presença do TLR4 que passa a ser altamente expresso nesse tecido; e também outros TLRs presentes em outros tipos de câncer como o de mama, próstata e estômago o que nos mostra que os TLRs podem servir como excelentes biomarcadores (BAUER AK, UPHAM BL, RONDINI EA, TENNIS MA, VELMURAGAN K, WIESE D. 2017). Ao olhar os resultados obtidos é possível visualizar que o marcador TLR 4 tem um grande potencial oferecer uma proteção em certos casos de câncer de pulmão ou para diagnóstico e/ou prognóstico em doenças autoimunes e neurodegenerativas ou asma, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, diabetes tipo 1 será o TLR4 forward primer ATGCCAGGATGATGTCTGCC e reverse primer GGATTTACACCTCCACGCA. Ao analisar distúrbios neurológicos, podemos destacar o papel modulador dos TLRs que tem merecido destaque como no AVC, onde o TLR2 e TLR4 iniciam reações pró-inflamatórias, o que agrava a lesão tecidual (KIM C, HO D-H, SUK J-E, *ET AL* 2013). Ao analisar os resultados obtidos os marcadores ideais para resposta imune de distúrbios neurológicos, são TLR2 que apresenta o primer AGGTGACTGCTCGGAGTT e reverse primer TCCAGTGCTTCAACCTTCAC, e TLR4 forward primer ATGCCAGGATGATGTCTGCC e reverse primer GGATTTACACCTCCACGCA. Os melhores resultados de predição de estrutura secundária apresentados para TLR foram TLR1 (-728,5), TLR2 variante 8 (-1019,8), TLR3 (-702,7), TLR4 variante 4 (-1522,8), TLR5 (-1196,3), TLR6 (-1695,4), TLR7 (-1317,5), TLR8 variante 2 (-1077,2), TLR9 (-1564,1) e TLR10 variante 2 (-897,7) e, os TLRs quando estimulados por ligantes onde podemos incluir o HMGB1, as HSPs e proteínas S100, irão ativar as vias de sinalização que promovem a ativação de NF- $\kappa$ B, MAPK e JNK (DROUIN-OUELLET J, ST-AMOUR I, SAINT-PIERRE M, *ET AL* 2014) assim iniciando a produção de citocinas e quimiocinas.

As proteínas de choque térmico (HSPs) pertencem a uma família que dão origem a proteínas conservadas, mas que apresentam ações diferentes onde as mesmas estão relacionadas ao reparo celular e também em mecanismos de defesa das células contra os mais variados tipos de estresse que a célula possa passar. Essas moléculas iniciam o enovelamento ou dobramento de outras proteínas, ou seja, atuando como chaperonas moleculares, o que faz com que tais proteínas não mudem suas conformações nativas submetidas a condições estressantes; são intracelulares e sua expressão é constitutivamente contida em condições homeostáticas ou proteostáticas. Ao passar por uma condição de estresse fisiológico, sua expressão aumenta e ela passa a ser liberada para o meio extracelular (PENNISI R, ASCENZI P, DI MASI A 2015;

PAUL S, MAHANTA S. 2014; TOLLE LB, STANDIFORD TJ.2013). Os potenciais marcadores HSP60 forward primer CGCCCCGCAGAAATGC e reverse primer TTTGGCATAAGCCCGAGTGA, HSP70 1LIKE forward primer GAGACTAGGCCTCAGAGAACCA e reverse primer CCTGGTCGTTGGCGATGAT, HSP70 4 forward primer ACACGAATCCCTGCGGTAAA e reverse primer CGATAAGATGGCACACTGCAA, HSP70 4LIKE forward primer TGCTTATAGGCTGCTGTTACTGG e reverse primer CGTTCGTGACTATCTGGCTCT, HSP70 5 forward primer ACCGCTGAGGCTTATTTGGG e reverse primer CTGCCGTAGGCTCGTTGATG, HSP70 9 forward primer TAGGATGCCCAAGGTTTCAGC e reverse primer AACACACCTCCCTGAATGGC, HSP70 12 forward primer GGACAGAGACCCGCACG e reverse primer GATGTGGGAGCCGTTTCTCG, HSP70 12B forward primer TACATCGAAACCCGAGGTCC e reverse primer GCATAGCCACTAGACGTGGT, HSP70 13 forward primer ACCCGAGCAATGTCTGGAAAC e reverse primer GGGCACGAAGCCATATGTTTG, HSP70 14 forward primer GGCAGAAGCTCCAGTGATCC e reverse primer TCTGGCAACATCTTCTGGGT, HSP90AA1 forward primer CCGTCGCTATATAAGGCAGGC e reverse primer GGTTTCCTCAGGCATCTTGGC, HSP90AB1 forward primer GCTGAAAATTGACATCTCCATGA e reverse primer GTGAAGGAACCTCCAGCAGA e HSP9B1 forward primer CCAGCACATCTGGGAGTCTG e reverse primer GACAAGGGTAATTGTCGTTCCC, são os mais relacionados as mais diversas patologias como distúrbios neurodegenerativos, câncer e isquemia, através do TLR2 e TLR4 dentre outras doenças(TOLLE LB, STANDIFORD TJ. 2013), podendo ser usadas como diagnóstico e/ou prognóstico. As funções das HSPs são alteradas nos processos oncogênicos e o aumento da manifestação de uma ou mais HSPs é uma característica muito marcante em neoplasias, onde a expressão de HSP90 aumentada cerca de 2 a 10 vezes mais em células cancerosas comparado às células normais, o que nos mostra que ela pode ser um alvo no tratamento do câncer, graças ao seu bloqueio que leva a destruição dos ligantes e com isso estimula tumoral pelas células natural killer(NK) melhoradas(PENNISI R & ASCENZI P & DI MASI A. 2015)e os marcadores HSP90 apresentados poderão avaliar o prognóstico do câncer. A HSP70 é 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+ e CD8+ regulando negativamente TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , onde apesar de apresentar uma efeito de proteção, apresenta muitos efeitos colaterais e também apresenta otites. Os marcadores HSP70 que foram descritos podem vir a ser

importantes para uma avaliação na proteção cerebral no AVC isquêmico. As HSPs menores, onde podemos citar as HSP HIKESHI, HSP10, HSP40 e HSP, mostraram um efeito protetor para catarata, doenças como Alzheimer e Parkinson(MYMRKOV E V& DAAKE M& RICHTER B& HASLBECK M&BUCHNER J.2017)e também no prognóstico de vários tipos de câncer(CARRA S& ALBERTI S& BENESCH JLP&ET AL.2019). Já as HSP40 estão envolvidas em câncer como o carcinoma hepatocelularfibrolamelar(TOMASINI MD, WANG Y, KARAMAFROOZ A, ET AL. 2018).

Proteínas S100 fazem parte de um grande grupo de proteínas de ligação ao cálcio(TURNIER JL&FALL N&THORNTON S, ET AL. 2017)e estão relacionadas à vários tipos de câncer, obesidade, diabetes, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, doenças pulmonares, e várias outras(SRIKRISHNA G&FREEZE HH.2009; TURNER NA. 2016; AHMAD S, KHAN H, SIDDIQUI Z, ET AL.2018; VAN LINTHOUT S& TSCHÖPE C. 2017), estas apresentam potencial como biomarcadores (TURNIER JL, FALL N, THORNTON S, ET AL 2017; WANG T & HUO X & CHONG Z & KHAN H & LIU R & WANG T. 2018). Os potenciais marcadores para diagnóstico, proteção e prognóstico destas doenças estão apresentados na TABELA 26. As S100 tem uma grande complexidade no desenvolvimento do câncer onde uma expressão aumentada ou diminuída acaba interferindo no prognóstico da doença, como no câncer de pâncreas onde pacientes tratados com terapia diferenciado e com alto nível de S100A2 apresentam um excelente índice de sobrevida e, já nos pacientes que foram submetidos a pancreatectomia, os baixos níveis de S100A2 apresentaram uma melhora no índice de sobrevivência e, altos níveis e S100A4 favorecem resistência a quimioterapia e à radioterapia em células pancreáticas cancerosas(LECLERC E & VETTER SW. 2015). Os marcadores que tem um grande potencial para o prognóstico do câncer são a S100A2 forward primer AGAGGGCGACAAGTTCAAGC e reverse primer GGTTCTCTGGAATGCCCCAC e S100A4 forward primer TCTTGGTTTGATCCTGACTGCT e reverse primer TCACCCTCTTTGCCCGAGTA. Podemos dizer também sobre a expressão elevada da S100B que está intimamente envolvida nos transtornos do humor, baixa perfusão em hemorragia intracerebral(WANG F & ZOU Z-R &YUAN D &ET AL. 2017) e o marcador potencial para avaliação destes transtornos sob aspecto diagnóstico e/ou prognóstico, de acordo com este estudo será S100B forward primer CAAGGAAGAGGATGTCTGAGC e reverse primer TGATGAGCTCCTTCAGTTCGG.

A escala utilizada foi a de antigenicidade de Kolaskar e Tongaonkar para a análise de predição de epítomos de células B, onde apresenta uma precisão de 75%, considerada a mais confiável (KOLASKAR AS &TONGAONKAR PC. 1990) pois utiliza determinantes

antigênicos, que utiliza escala simples de antigenicidade baseada em propriedades físico-químicas e frequência de aminoácidos (SANCHEZ-TRINCADO JL & GOMEZ-PEROSANZ M & RECHE PA. 2017). Neste estudo *in silico*, o epítipo linear foi analisado por ser capaz de reconhecer antígenos desnaturados (SANCHEZ-TRINCADO JL & GOMEZ-PEROSANZ M & RECHE PA. 2017). As células B identificam antígenos expostos a solventes através de seus receptores, levando à secreção de imunoglobulinas (anticorpos) que irão medir a resposta adaptativa humoral (SANCHEZ-TRINCADO JL & GOMEZ-PEROSANZ M & RECHE PA. 2017), já as células T necessitam da ligação do antígeno ao MHC (complexo principal de histocompatibilidade) expresso por APCs (células apresentadoras de antígenos) que desencadeia a resposta adaptativa mediada por células (SANCHEZ-TRINCADO JL & GOMEZ-PEROSANZ M & RECHE PA. 2017; PAUL S & SIDNEY J & SETTE & PETERS B. 2016). As TABELAS 10 a 15 nos mostra a seleção de epítopos com pontuação máxima, o que garante maior estabilidade na estrutura do mRNA com potencial antigênico, que possam ser usados em ensaios sorológicos, onde irá favorecer a construção de plataformas de imunodiagnóstico. Em testes futuros, poderão testar anticorpos com intuito de bloquear estes PRRs e DAMPs, ou até mesmo utilizar peptídeos produzidos em laboratórios na forma sintética ou recombinante como marcadores ou moduladores da resposta imune, o que irá auxiliar no entendimento de mecanismos patológicos nos seres humanos. Outros estudos em andamento tem mostrado que o TLR2 nas sinucleinopatias em idosos que são neuropatias que incluem doença de Parkinson e demência com corpos de Lewy, onde ocorre o acúmulo 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 (KIM C & HO D-H & SUK J-E, *ET AL* 2013; KIM C & SPENCER B & ROCKENSTEIN E, *ET AL* 2018).

A análise de similaridade foi realizada levando em conta a possibilidade de estudos em modelos animais (López-Díez R & Rastrojo A & Villate O & Aguado B. 2013; Adin CA, Gilor C. 2018). A análise do BLAST, determinou que há sequências conservadas em algumas espécies e verificou que algumas sequências de nucleotídeos são exclusivas para o *Homo sapiens*. Considerando os resultados o TLR 1, TLR2 variantes 1 a 6, TLR4 variantes 1, 3 e 4, TLR5, TLR6, TLR10, 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, serão aptos para serem utilizados 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 (LÓPEZ-DÍEZ R & RASTROJO A & VILLATE O & AGUADO B. 2013; ADIN CA, GILOR C. 2018).

## **6 CONCLUSÃO**

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

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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>.

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>.

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.

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>.

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>.

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

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>.

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>.

BORASCHI D, ITALIANI P, WEIL S, MARTIN MU. The family of the interleukin-1 receptors. **Immunol. Rev.** [Internet]. 281(1), 197–232 (2018). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12606>.

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

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X17301729?via%3Dihub>.

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>.

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).

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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.

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>.

PROSDOCIMI, F. **CURSO ON LINE INTRODUÇÃO À BIOINFORMÁTICA.**

Disponível em: <[http://biotec.icb.ufmg.br/chicopros/Prosdocimi07\\_Curso](http://biotec.icb.ufmg.br/chicopros/Prosdocimi07_Curso)>. Acesso em: 13 maio. 2019b.

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>.

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).

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>.

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>.

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>.

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 greyscales and 2 color illustrations. **Antioxid Redox Signal**[Internet]. (2017). Available from: <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7069>.

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>:

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.

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>.

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>.

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>.

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.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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

WADSWORTH S, SIN D, DORSCHIED 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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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).

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>.

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.

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>.

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>.