

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 21/06/2024.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA
MESTRADO ACADÊMICO**

ANDERSON AMENDOLA PINHEIRO

**DETERMINAÇÃO, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE PEPTÍDEOS IMUNOGÊNICOS DA
PROTEÍNA ESTRUTURAL S DO VÍRUS SARS-COV-2**

**ARARAQUARA, SP
JUNHO DE 2022**

ANDERSON AMENDOLA PINHEIRO

DETERMINAÇÃO, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE PEPTÍDEOS IMUNOGÊNICOS DA
PROTEÍNA ESTRUTURAL S DO VÍRUS SARS-COV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Troiano Feliciano

ARARAQUARA, SP

JUNHO DE 2022

ESTE TRABALHO FOI FINANCEIRAMENTE APOIADO COM UMA BOLSA DE ESTUDOS DO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) DURANTE 24 MESES ATRAVÉS DO PROCESSO 131680/2020-0.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E/OU DIVULGAÇÃO, SEJA ELA TOTAL OU PARCIAL, DESTE DOCUMENTO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

P654d Pinheiro, Anderson Amendola.
Determinação, síntese e aplicação de peptídeos imunogênicos da proteína estrutural s do vírus SARS-COV-2 / Anderson Amendola Pinheiro. – Araraquara: [S.n.], 2022.
99 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área Imunologia.

Orientador: Paulo Inácio da Costa.
Coorientador: Gustavo Troiano Feliciano.

1. SARS-CoV-2. 2. COVID-19. 3. Glicoproteína Spike. 4 Epítomos.
5. Imunossensores. I. Costa, Paulo Inácio, orient. II. Feliciano, Gustavo Troiano, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Determinação, síntese e aplicação de peptídeos imunogênicos da proteína estrutural S do vírus SARS-CoV-2

AUTOR: ANDERSON AMENDOLA PINHEIRO
ORIENTADOR: PAULO INACIO DA COSTA
COORIENTADOR: GUSTAVO TROIANO FELICIANO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: Imunologia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ALEX JOSÉ LEITE TORRES (Participação Virtual)
Departamento de Biomorfologia / Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. PAULA RAHAL (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - Unesp

Araraquara, 21 de junho de 2022

DEDICATÓRIA

Para Aline, Álvaro, Sueli e Ernesta.

Para você, caro colega cientista/acadêmico/curioso, que tirar proveito dos conhecimentos aqui estabelecidos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, aos meus pais, Álvaro e Sueli, por batalharem todos esses anos para que não me faltasse nada, em especial, a oportunidade de vir à Araraquara.

Aos meus avós, José e Josefa (*in memoriam*), Ernesta e Pedro (*in memoriam*) pela orientação, conselhos e criação.

À minha família, por todo suporte, apoio e momentos de descontração e reflexão.

À Aline, pelo amor, pelo carinho, pelo companheirismo essencial para que eu trilhasse esse caminho do começo até o fim.

Ao meu Orientador, Professor Paulo, pela oportunidade, amizade, pelos ensinamentos e orientação.

Ao meu Coorientador, Professor Gustavo, pela oportunidade, pela amizade, pelos ensinamentos e pela orientação. Ao Anderson, colaborador essencial em todos os aspectos relacionados aos experimentos de MD.

Aos amigos do “LICBM” Aline, Lorrane, Bruna, Rafa, Anna, Nicoly, Eli, Rualdinho, Helô e Felipinho, pelos momentos de descontração, pela parceria diária, pelos cafés, pelas risadas e conselhos indispensáveis nos bastidores da produção científica.

À UNESP, em nome da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio institucional de infraestrutura e recursos humanos, em especial as meninas da Seção de Pós-Graduação (Claudinha, Ani e Denise), por todos os lembretes e pela ajuda em tudo que foi necessário. Ao professor André e ao Vinicius, por todo apoio, suporte e treinamento durante os experimentos com o cromatógrafo líquido. Ao Dr. Deivys, por todo suporte durante a implementação da síntese de peptídeos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido e indispensável para realização do trabalho (Processo 131680/2020-0).

A big thanks to Alexandra Elbakyan for constantly removing barriers in the way of science.

Por fim, mas não menos importante, a Deus, que diariamente esteve presente, como guia dos meus passos.

*Though I can't believe it
Like master of the observation
Coming up with an explanation*

[...]

*We can give you answers you are dying to receive
Keep on dreaming
Keep on screaming*

[...]

*Shine your light into the darkness
And let the storm descend upon you*

Let the storm descend upon you
– Tobias Sammet's AVANTASIA

RESUMO

A Pandemia de COVID-19 já custou ao mundo incontáveis perdas humanas, sociais e econômicas. SARS-CoV-2, seu agente etiológico, é um *Betacoronavirus* envelopado com um genoma composto por RNA de fita simples e senso positivo que codifica quatro proteínas estruturais, sendo a glicoproteína *Spike* a mais importante devido a sua função de reconhecer o receptor ACE2 e ancorar o vírus na superfície da células hospedeira. Dado o *knowhow* de nosso grupo em desenvolver métodos diagnósticos inovadores para vírus de RNA, o presente trabalho propôs identificar e caracterizar na glicoproteína *Spike* alvos moleculares para serem aplicados em um sensor imunoeletroquímico. Para tal, um método combinatório baseado em inteligência artificial identificou 13 potenciais sítios imunodominantes espalhados por toda proteína S. Estes sítios variam de 12 a 22 aminoácidos de extensão. Através de experimentos de Dinâmica Molecular pudemos caracterizar tais epítomos e avaliar parâmetros bioquímicos e biofísicos importantes para o processo de interação antígeno-anticorpo. Foi constatado que tanto a proteína S quanto os nossos sítios apresentam boa estabilidade conformacional. Também pudemos avaliar a Área Superficial Acessível ao Solvente (SASA) em duas condições e determinar que, para os epítomos encontrados na região RBD, a mais relevante para o reconhecimento dos anticorpos, essa acessibilidade varia de acordo com a conformação adotada pelo RBD. Quando este encontra-se fechado, os epítomos estão mais inacessíveis, e quando ele está aberto, os epítomos são significativamente mais acessíveis. Por fim, após implementarmos e validarmos uma estratégia de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida no laboratório, pudemos obter quatro epítomos a fim de os validarmos no sensor eletroquímico. Foram produzidos um epítomo Controle, publicado na literatura como sítio antigênico, e os epítomos E7, E8 e E9, alguns dos mais interessantes em termos de localização e propriedades bioquímicas. O epítomo E7 foi utilizado para validarmos o sistema sensor com bons resultados preliminares.

Palavras-Chave: SARS-CoV-2, COVID-19, Glicoproteína *Spike*, Epítomos, Imunossensores

ABSTRACT

The COVID-19 Pandemic has already cost the world countless human, social and economic losses. SARS-CoV-2, its etiologic agent, is an enveloped Betacoronavirus with a genome composed of single-stranded, positive-sense RNA that encodes four structural proteins, with the Spike glycoprotein being the most important due to its function of recognizing the ACE2 receptor and anchoring the virus on the host cell surface. Given the know-how of our research group in developing innovative diagnostic methods for RNA viruses, the present work proposed to identify and characterize molecular targets in the Spike glycoprotein to be applied in an immunoelectrochemical sensor. To this end, a combinatorial method based on artificial intelligence identified 13 potential immunodominant sites scattered throughout the entire S protein. These sites range from 12 to 22 amino acids in length. Through Molecular Dynamics experiments we were able to characterize such epitopes and evaluate important biochemical and biophysical parameters for the antigen-antibody interaction process. It was found that both the S protein and our sites have good conformational stability. We were also able to evaluate the Solvent Accessible Surface Area (SASA) under two conditions and determine that, for the epitopes found in the RBD region, the most relevant for antibody recognition, this accessibility varies according to the conformation adopted by the RBD. When it is closed, epitopes are more inaccessible, and when it is open, epitopes are significantly more accessible. Finally, after implementing and validating a Solid Phase Peptide Synthesis strategy in the laboratory, we were able to obtain four epitopes in order to validate them in the electrochemical sensor. Control, E7, E8 and E9 epitopes were produced, the most interesting in terms of location and biochemical properties. The epitope E7 was used to validate the sensor's platform with good preliminary results.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, Spike glycoprotein, Epitopes, Immunosensors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características gerais de diferentes espécies de coronavírus.....	16
Figura 2. Estrutura geral do genoma e do virion de SARS-CoV-2.....	20
Figura 3. Aspectos estruturais da glicoproteína <i>Spike</i> de SARS-CoV-2.....	22
Figura 4. Elementos básicos de um Biossensor.....	31
Figura 5. Estratégia de mapeamento dos potenciais epítomos lineares de célula B.....	51
Figura 6. Localização dos epítomos preditos na glicoproteína <i>Spike</i>	54
Figura 7. Aspectos dinâmicos da proteína S durante 100 ns de simulação.....	57
Figura 8. Evolução dinâmica dos epítomos preditos quando internos a estrutura da proteína S no sistema 6VXX.....	59
Figura 9. Valores de SASA dos epítomos mapeados no RBD da proteína S.....	61
Figura 10. Interações entre anticorpos e a região RBD da proteína <i>Spike</i>	62
Figura 11. RMSD dos epítomos E5 - E9 ao longo de 1 μ s de simulação.....	63
Figura 12. Evolução dinâmica e <i>folding</i> dos epítomos E5 - E9 quando isolados.....	65
Figura 13. Identificação do peptídeo Controle obtido através de SPPS.....	68
Figura 14. Identificação do peptídeo E7 obtido através de SPPS.....	70
Figura 15. Espectro de massas do peptídeo E8.....	71
Figura 16. Espectro de massas do peptídeo E9.....	71
Figura 17. Modelo do Sensor de Ouro Serigrafado Metrohm DropSens 220AT utilizado nos experimentos.....	73
Figura 18. Teste dos sensores.....	74
Figura 19. Alinhamento aplicado aos dados brutos da análise no servidor iBCE-EL.....	93
Figura 20. Alinhamento comparativo completo, com destaque para os epítomos imunodominantes identificados.....	96
Figura 21. Estrutura tridimensional da proteína <i>Spike</i> com destaque para a área coberta pelos epítomos identificados por aplicação individual.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos sistemas parametrizados para os experimentos de Dinâmica Molecular.....	39
Tabela 2. Peptídeos possivelmente imunogênicos obtidos nas plataformas DBLEpitope, BepiPred 2.0 e iBCE-EL.....	48
Tabela 3. Epítomos de Célula B imunodominantes da proteína <i>Spike</i> encontrados na análise combinatória.....	52
Tabela 4. Evolução genética e a presença de mutações nos epítomos mapeados dentre as principais variantes de SARS-CoV-2.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ng	Nanograma
µg	Micrograma
mg	Miligrama
g	gramas
µL	Microlitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
µM	Micromolar
mM	Milimolar
M	Molar
ps	Picossegundo
fs	Femtosegundo
ns	Nanosegundo
µs	Microsegundo
s	Segundo
min	Minuto
h	Hora
N-terminal	Extremidade amino-terminal
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
S1	Subunidade 1 da proteína <i>Spike</i>
S2	Subunidade 2 da proteína <i>Spike</i>
NTD	Domínio N-terminal
RBD	Domínio de Ligação ao Receptor
RBM	<i>Motif</i> de Ligação ao Receptor
KCl	Cloreto de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
HCl	Ácido clorídrico
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
kDa	Quilodalton
pH	Potencial Hidrogeniônico
xg	aceleração

kb	Kilobase
DMF	Dimetilformamida
DCM	Diclorometano
PBS	Tampão salina com fosfato
BSA	Albumina do Soro Bovina
V	Volt
mV	Milivolt
rpm	Rotações por minuto
m/v	Relação massa / volume
° C	Graus Celsius
K	Graus Kelvin

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Letra grega Alfa (minúscula)
β	Letra grega Beta (minúscula)
γ	Letra grega Gama (minúscula)
δ	Letra grega Delta (minúscula)
Δ	Letra grega Delta (maiúscula)
ϵ	Letra grega Épsilon (minúscula)
θ	Letra grega Theta (minúscula)
λ	Letra grega Lambda (minúscula)
μ	Letra grega Mi (minúscula)
π	Letra grega Pi (minúscula)
ϕ	Letra grega Phi (maiúscula)
∇	Operador Hamiltoniano Nabla
∂	Símbolo matemático para Derivada Parcial
Σ	Símbolo matemático para Somatória
\vec{x}	Símbolo matemático para Vetor (da variável genérica x)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
1.1 Os Coronavírus.....	15
1.2 SARS-CoV-2 e a pandemia de COVID-19.....	17
1.2.1 Surto inicial, possíveis origens e os aspectos clínicos da COVID-19.....	17
1.2.2 SARS-CoV-2.....	19
1.2.3 A glicoproteína <i>Spike</i>	21
1.3 Epítomos de Célula B: estrutura, predição e aplicações.....	24
1.4 Estudos atomísticos de Dinâmica Molecular.....	26
1.5 Biossensores e suas aplicações.....	30
1.6 Justificativa.....	33
2 HIPÓTESE.....	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Análises de bioinformática e imunoinformática da proteína <i>Spike</i>	36
4.1.1 Predição de epítomos lineares de célula B.....	36
4.1.2 Análise comparativa e identificação dos epítomos dominantes.....	37
4.1.3 Alinhamento, modelagem tridimensional e análises complementares.....	37
4.2 Simulações atomísticas via Dinâmica Molecular.....	38
4.2.1 Preparo do modelo da proteína <i>Spike</i>	38
4.2.2 Preparo dos modelos dos epítomos E5 – E9.....	39
4.2.3 Minimização da energia, termalização do sistema e produção das dinâmicas.....	39
4.2.4 Análise das trajetórias.....	40
4.3 Produção e caracterização dos epítomos.....	40
4.3.1 Reagentes.....	40
4.3.2 Síntese química de Peptídeos em Fase Sólida (SPPS).....	41
4.3.3 Clivagem.....	41
4.3.4 Análise da identidade molecular por Espectrometria de Massas (CID-MS2).....	42
4.3.5 Determinação do perfil cromatográfico produtos de síntese por HPLC.....	42
4.4 Desenvolvimento e teste de imunossensor eletroquímico para detecção de anticorpos anti-S.....	43
4.4.1 Sensores.....	43
4.4.2 Lavagem do sensor e imobilização dos epítomos.....	43
4.4.3 Incubação com os soros e leitura imunossensores.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Mapeando os determinantes antigênicos da glicoproteína <i>Spike</i>	45
5.2 Características gerais dos epítomos preditos.....	53
5.3 Dinâmica Molecular com a proteína S e seus epítomos.....	56
5.3.1 O trímero S é estável e seu comportamento dinâmico é “sincronizado”.....	56
5.3.2 Acessibilidade superficial dos epítomos.....	60
5.3.3 Evolução dinâmica dos epítomos encontrados na região RBD.....	62
5.4 Obtenção e caracterização química dos epítomos.....	66
5.5 Teste dos imunossensores funcionalizados com E7 para detecção de anticorpos anti-S.....	72
6 CONCLUSÕES.....	75
7 PERSPECTIVAS.....	76
8 REFERÊNCIAS.....	77

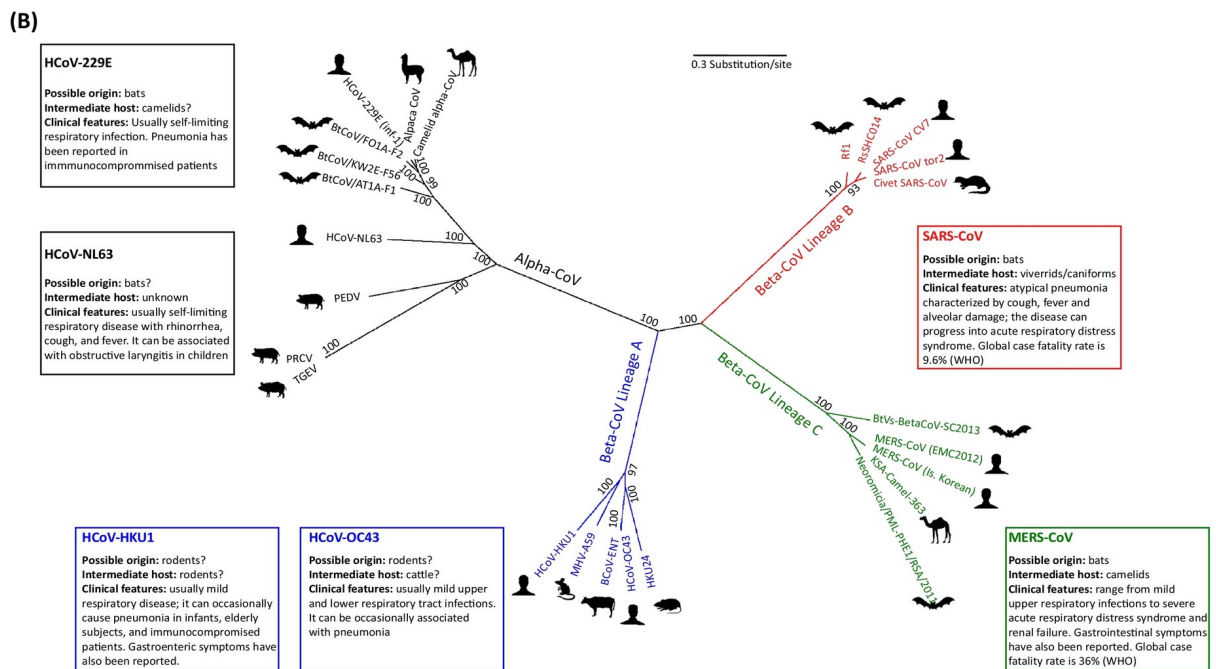
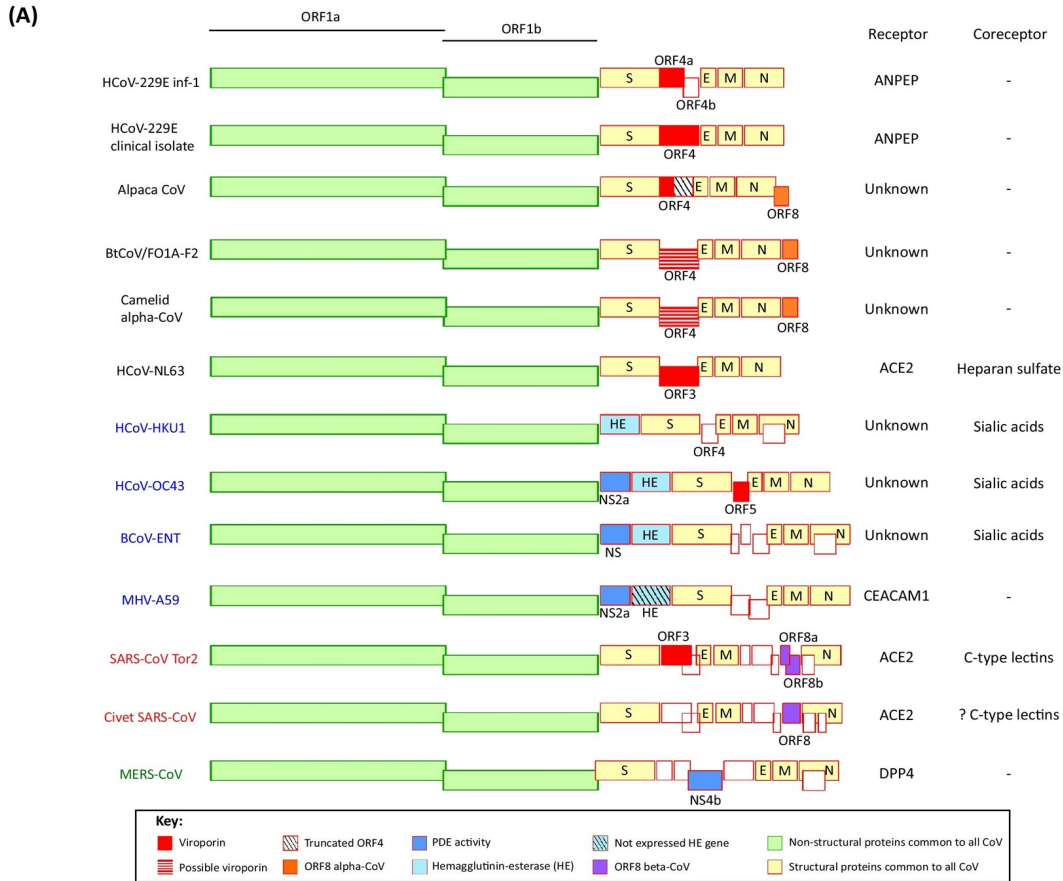
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Os Coronavírus

Os coronavírus são um grupo de vírus de RNA envelopados, cosmopolitas entre os continentes habitados, conhecidos desde a primeira metade do século XX, que infectam mamíferos e aves e causam patologias respiratórias, neurológicas, hepáticas e entéricas, agudas e/ou crônicas (WEISS; LEIBOWITZ, 2011). O termo “corona” foi atribuído na década de 1960 quando estes vírus foram observados pela primeira vez através de microscopia eletrônica e refere-se a microestrutura do envelope viral que se assemelha a uma “coroa” devido a presença das espículas, ou proteínas *Spike*, as que o vírus usa para ligar-se aos receptores presentes em uma célula hospedeira (PEIRIS, 2016). Taxonomicamente, estes vírus pertencem à ordem Nidovirales, família Coronaviridae, subfamília *Orthocoronavirinae*. As diferentes espécies de coronavírus são distribuídas entre quatro gêneros: os *Alphacoronavirus* (α CoVs), *Betacoronavirus* (β CoVs), *Gammacoronavirus* (γ CoVs) e *Deltacoronavirus* (δ CoVs) (CUI; LI; SHI, 2018).

O material genômico dos coronavírus é composto por fitas simples de RNA de sentido positivo (+ssRNA), fica armazenado enrolado e associado à proteínas do nucleocapsídeo no interior do virion, e por ser de sentido positivo, já se apresentam na forma de mensageiros prontos para serem traduzidos pelos ribossomos nas células hospedeiras. Os coronavírus são os vírus de RNA com os maiores genomas conhecidos, que podem passar de 30 kb de extensão (PEIRIS, 2016). É interessante pontuar que a organização dos genes presentes no genoma desses vírus segue um padrão específico que pode ser observado em praticamente todas as espécies conhecidas, assim como destacado na Figura 1A. Nele, o genoma fica dividido em duas porções, uma compreendendo a extremidade 5' e a outra a extremidade 3'. Na extremidade 5' encontra-se a ORF1a/b que codifica proteínas não estruturais como as proteases (ORF1a) e maquinaria de replicação (polimerase/helicase, ORF1b), além de proteínas regulatórias/auxiliares. Já na extremidade 3' encontram-se as proteínas estruturais do vírus seguindo a ordem S (*Spike*) – E (envelope) – M (de membrana) – N (nucleocapsídeo), podendo conter a hemaglutinina (HE), além de proteínas regulatórias/auxiliares. No total, em torno de 30 proteínas são codificadas (FORNI et al., 2016; PEIRIS, 2016).

Figura 1. Características gerais de diferentes espécies de coronavírus. **a)** Organização genômica com destaque para a estrutura típica encontrada entre coronavírus. **b)** Relações taxonômicas e principais características dos coronavírus de importância médica antes do surgimento de SARS-CoV-2.



Fonte: adaptada de FORNI et al., 2017.

Até o fim do ano de 2019, eram conhecidas seis espécies de coronavírus com importância médica capazes de infectar e causar alguma doença em seres humanos, doenças estas que vão desde o resfriado comum (para os vírus 229E, OC43, NL63 e HKU1) à patologias respiratórias graves e muitas vezes fatais (para os vírus SARS-CoV-1 e MERS-CoV) (SU et al., 2016; CUI; LI; SHI, 2018). Todas estas seis espécies são pertencentes aos gêneros dos *Alphacoronavirus* e dos *Betacoronavirus*, que infectam aves e mamíferos (Figura 1B).

Uma característica importante dessas espécies é sua origem zoonótica, com hospedeiro natural e possíveis hospedeiros intermediários identificados. HCoV-229E, HCoV-NL36, MERS-CoV e SARS-CoV possuem variantes ancestrais e/ou muito próximas circulando em morcegos, seu principal reservatório e possivelmente hospedeiro natural. Ambos HCoV-HKU1 e HCoV-OC43 possuem possível origem em roedores. A partir de seus reservatórios naturais, esses vírus utilizam espécies próximas aos seres humanos para saltarem, como camelídeos, bovinos e mamíferos de pequeno porte, além disso, o salto direto entre o hospedeiro natural e o homem também pode ocorrer em regiões onde o contato é frequente (WEISS; LEIBOWITZ, 2011; PEIRIS, 2016 ; FORNI et al., 2017).

1.2 SARS-CoV-2 e a pandemia de COVID-19

1.2.1 Surto inicial, possíveis origens e os aspectos clínicos da COVID-19

Em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, capital da província de Hubei, China, foi constatado um surto de pneumonia de causa até então desconhecida, e em 7 de Janeiro de 2020, autoridades sanitárias chinesas isolaram, a partir de pacientes em Wuhan, uma nova variante de coronavírus diretamente relacionada com tais casos (ZHU et al., 2020). A rápida identificação e sequenciamento do novo vírus permitiram o desenvolvimento de métodos diagnósticos baseados em PCR em tempo real (RT-qPCR), fato que auxiliou pesquisadores e autoridades em saúde a mapear a veloz expansão do número de casos e da área afetada, e ao final de Janeiro de 2020, quase 10 mil casos já haviam sido identificados em 20 países, sendo a maioria ainda concentrada em território Chinês (WHO, 2020a; CORMAN et al., 2020). Devido ao cenário, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a epidemia uma Emergência de Saúde Pública de Âmbito Internacional (WHO, 2020b).

O primeiro caso do novo coronavírus confirmado no Brasil se deu em 27 de fevereiro de 2020, importado da Itália. Neste ponto, o vírus já era denominado 2019n-CoV. Durante a escrita do projeto que deu origem ao presente trabalho o país possuía quase 1.2 milhão de casos, com ~54 mil mortes confirmadas (WHO, 2020c; BRASIL, 2020a). Durante a escrita do presente documento, o Brasil soma quase 29 milhões de casos e quase 700 mil óbitos (BRASIL, 2020b). A OMS reconheceu a pandemia do novo vírus no dia 11 de março de 2020 (WHO, 2020d). Por recomendação do Grupo de Estudos dos Coronaviridae, parte do Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus, 2019n-CoV foi oficialmente reconhecido como SARS-CoV-2 devida sua similaridade com o vírus SARS-CoV original, agora SARS-CoV-1, com quem compartilha cerca de 80% de similaridade genômica (GORBALENYA et al., 2020).

A origem do novo vírus ainda é uma incógnita em aberto, entretanto, é interessante salientar que, como já comentado, todos os coronavírus conhecidos por infectar humanos possuem origem zoonótica, que também pode ser o caso de SARS-CoV-2 (CUI; LI; SHI et al., 2019). As análises das primeiras sequências publicadas indicam uma provável origem em morcegos, uma vez que seu genoma apresenta 96,2% de identidade com a espécie BatCoV RaTG13, também identificada na China e derivada de SARS-CoV (ZHOU et al., 2020), hipótese que é sustentada pelo fato de que ambos SARS-CoV e MERS-CoV, de maior importância epidemiológica, possuem origem e reservatório em morcegos (LI et al., 2005; MOHD; AL-TAWFIQ; MEMISH, 2016; ZHOU et al., 2020).

Se levarmos em consideração os surtos anteriores de *Betacoronavírus*, como o de 2002-2003 para SARS-CoV e os de 2013-2016 para MERS-CoV, além de se originarem em morcegos, estes vírus contaram com outros mamíferos como intermediários (civetas e dromedários, respectivamente) entre estes e os seres humanos, o que levou diversos grupos a propor os mais prováveis intermediários entre o novo coronavírus e o homem (RABI et al., 2020). Três estudos mais recentes também buscaram aprofundar a discussão em relação a origem de SARS-CoV-2 e demonstraram, através de análises filogenéticas detalhadas, que sua origem pode ser reconstruída a partir de variantes que circulam em espécies de morcegos do gênero *Rhinolophus*, e que as amostras obtidas dos primeiros pacientes afetados apontam como epicentro e marco zero o mercado *Huanan Seafood Wholesale Market*, em Wuhan, onde havia a venda e contato direto com animais silvestres passíveis de carregarem variantes de coronavírus (LYTRAS et al., 2022; PEKAR et al., 2022; WOROBEY et al., 2022).

SARS-CoV-2 é um vírus de transmissão respiratória que causa a doença infectocontagiosa COVID-19 (do inglês *Coronavirus Disease 2019*). Pacientes portadores tipicamente

apresentam um período de incubação que pode durar até 14 dias, com média de 5 dias para o aparecimento dos primeiros sintomas, que incluem, mas não se limitam a febre, tosse seca, fadiga, dispneia, mialgia, desordens gastrointestinais (majoritariamente diarreia e náusea), perda de paladar e olfato e falta de ar (JIANG et al., 2020; SUN et al., 2020). É esperada para a maioria dos pacientes positivos para a COVID-19 uma evolução de leve a moderada, e os sintomas podem persistir de uma a duas semanas. Uma parcela relevante dos infectados pode ser assintomática, o que facilita o espalhamento do vírus e dificulta as medidas de contenção. Pacientes que evoluem para a forma grave da COVID-19 necessitam de tratamento em unidade intensiva (UTI) com o uso de respiradores (ZHOU et al., 2020). Com o aparecimento das variantes, houveram mudanças significativa no período de incubação, na sintomatologia, nos marcadores clínicos e na gravidade da doença (ONG et al., 2021; HUANG et al., 2021; CHRISTENSEN et al., 2022; JASSAT et al., 2022).

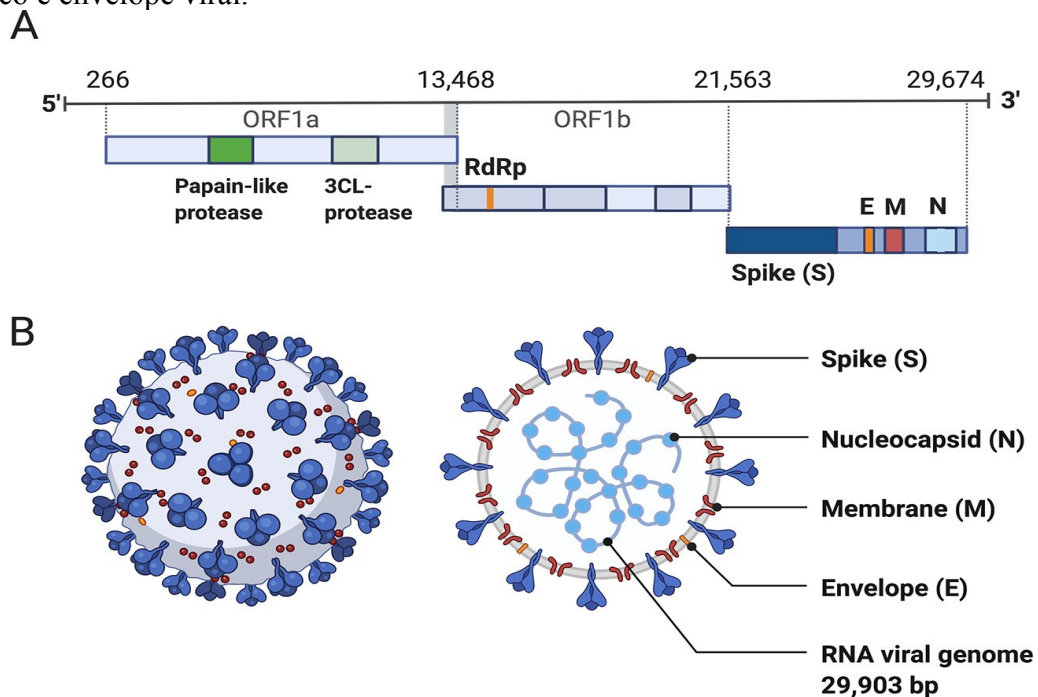
Em termos de achados radiológicos, segundo observações de Guan e colaboradores (GUAN et al., 2020), mais de 86% das Tomografias Computadorizadas (CT scans) realizadas em pacientes chineses no momento de sua admissão nos hospitais se apresentaram alteradas, sendo a Opacidade em Vidro-Fosco e a Opacidade Irregular Bilateral as anomalias mais comuns. No que se diz respeito a achados laboratoriais, foram observados níveis elevados de proteína C-reativa na maioria dos pacientes, bem como níveis elevados de lactato desidrogenase, além de linfocitopenia, trombocitopenia, leucopenia e tempo de protrombina prolongado (GUAN et al., 2020; WANG et al., 2020; ZHOU et al., 2020).

1.2.2 SARS-CoV-2

Em relação aos aspectos de sua virologia, SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, esférico e pertencente ao gênero dos *Betacoronavirus* (β CoVs), cujo virion mede entre 100 e 160 nm de diâmetro. Seu genoma possui aproximadamente 30 kb de extensão e é formado por moléculas de RNA fita simples de senso positivo (+ssRNA) com duas regiões bem definidas, a extremidade 5'-replicase e a extremidade 3'-estrutural (Figura 2A) (CHAN et al., 2020). Na extremidade 5' do genoma viral, que cobre aproximadamente dois terços do total, encontram-se as ORFs 1a e 1b, cada qual codifica uma poliproteína (pp1a e pp1b) passível de ser clivada em ao menos 16 proteínas não-estruturais (no total, nsp1 – 16), enquanto na extremidade 3', as ORFs restantes são traduzidas a partir de 9 RNAs mensageiros subgenômicos em cerca de

13 proteínas. É nessa região que se encontram codificadas as 4 proteínas estruturais do vírus: a glicoproteína de superfície (ou spike, S), a glicoproteína de membrana (M), a fosfoproteína do nucleocapsídeo (N) e a proteína do envelope (E). Além das proteínas estruturais, na extremidade 3' do genoma viral também estão presentes 9 fatores acessórios. Essa espécie não possui a hemaglutinina esterase (HE) (CHAN et al., 2020). A Figura 2B esquematiza a estrutura básica da partícula viral de SARS-CoV-2.

Figura 2. Estrutura geral do genoma e do virion de SARS-CoV-2. **a)** Estrutura do genoma, com indicação da localização dos genes estruturais, acessórios e não-estruturais. **b)** Estrutura da partícula viral madura, mostrando a localização relativa das proteínas estruturais, material genético e envelope viral.



Fonte: RANDO et al., 2020.

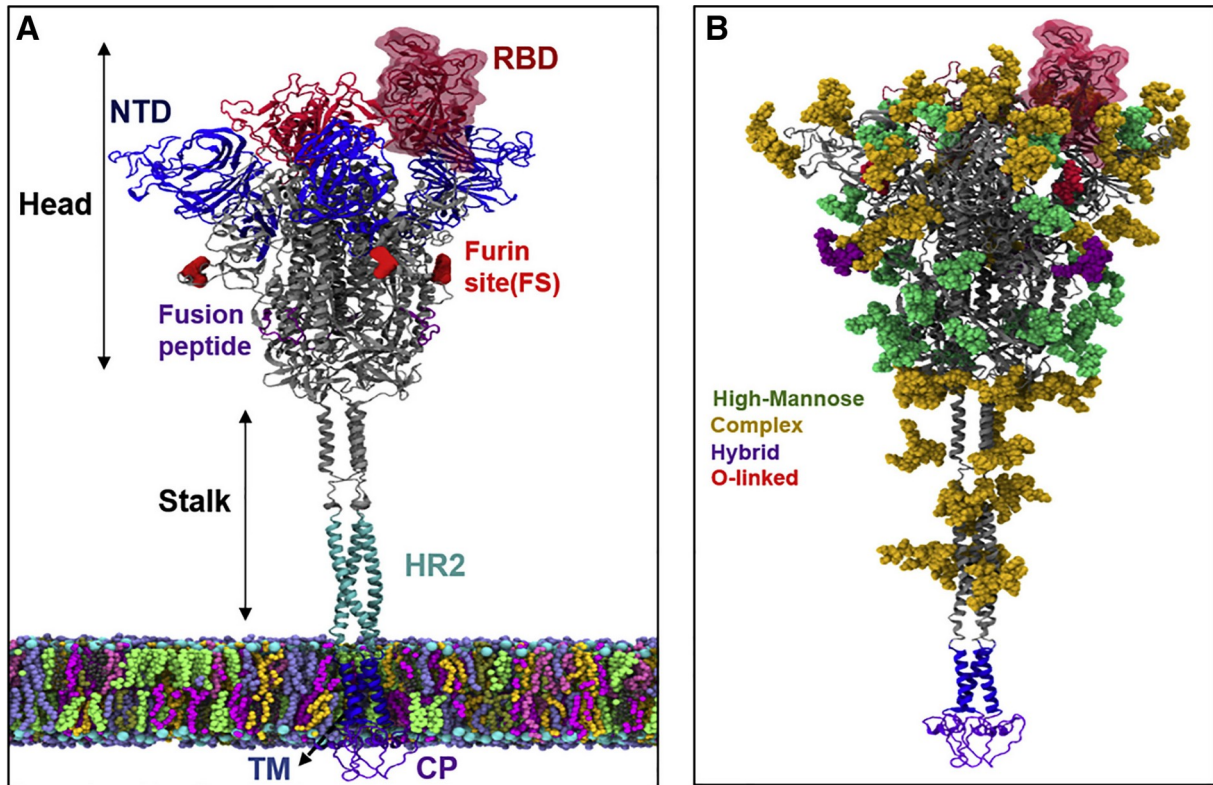
Muito da biologia que envolve o ciclo viral de SARS-CoV-2 foi inicialmente elucidada baseado na literatura sobre SARS-CoV-1, com quem compartilha ~80% de identidade estrutural (LU et al., 2020). SARS-CoV-1 utiliza a glicoproteína S sob a forma de um trímero para o reconhecimento e a fusão junto membrana celular durante o processo de entrada (SIMMONS et al., 2013). O receptor utilizado por SARS-CoV-1 é a enzima ACE2 (*Angiotensin-Converting Enzyme type II*) (XU et al., 2020). Durante o reconhecimento, o trímero S é clivado pela ação de proteases da superfície celular em duas subunidades, S1 e S2, estando localizado na subunidade S1 o domínio de reconhecimento do receptor (RBD), que se liga diretamente ao domínio peptidase de ACE2, enquanto o domínio S2 é responsável pela fusão à membrana (LI et al., 2005; BELOUZARD; CHU; WHITTAKER, 2009; SIMMONS et al., 2013). A estrutura da glicoproteína S de SARS-CoV-2 foi satisfatoriamente determinada por Microscopia Crio-

Eletrônica no início de março de 2020 revelando que a estrutura é otimizada para a interação com o receptor ACE2, com uma ligação cerca de 10 vezes mais forte se comparada a SARS-CoV e uma constante de dissociação de (Kd) de aproximadamente 15 nM (WRAPP et al., 2020; YAN et al., 2020; ANDERSEN et al., 2020).

1.2.3 A glicoproteína *Spike*

Como já comentado, SARS-CoV-2 utiliza a glicoproteína *Spike*, uma proteína de fusão de classe I, como porta de entrada para a infecção de suas células hospedeiras. A proteína S é uma proteína transmembranar encontrada no envelope viral na forma de homotrímeros. Há duas porções distintas na proteína S: a cabeça (ou *head*), que tende a morfologia globular, e o pedestal (ou *stalk*), mais helicoidal/fibroso (Figura 3A). Cada protômero individual que compõe o trímero S maduro possui 1273 aminoácidos de extensão e é fisicamente dividido em duas subunidades funcionais: S1 e S2 (WRAPP et al., 2020). A divisão da proteína S em suas subunidades ocorre durante a passagem da mesma pelo retículo endoplasmático da célula hospedeira, durante a fase final da infecção celular, e é ocasionada pela ação da protease furina, que reconhece uma sequência específica de aminoácidos, a sequência 681-PRRAR↓S-686, e cliva cada uma das três unidades *Spike* entre os aminoácidos R685 e S686 (CHENG et al., 2020).

Figura 3. Aspectos estruturais da glicoproteína *Spike* de SARS-CoV-2. **a)** Modelo tridimensional completo (*head + stalk*) da proteína ancorada em uma bicamada lipídica com destaque para os domínios N-terminal (NTD, azul), de ligação ao receptor (RBD, vermelho), Heptad Repeat 2 (HR2, turquesa), transmembranar (TM, azul marinho) e citoplásmico (CP, roxo), além do sítio de clivagem da furina. **b)** Localização das glicosilações conhecidas na proteína S, sendo as complexas marcadas em amarelo-ouro, as híbridas em roxo, as de alto teor de manose em verde-musgo e as O-glicosilações em vermelho.



Fonte: adaptada de GHORBANI; BROOKS; KLAUDA, 2021.

As subunidades da proteína S possuem funcionalidades distintas e essa primeira clivagem é tida como uma das vantagens evolutivas que tornam SARS-CoV-2 mais infeccioso que seu antecessor, o vírus SARS-CoV-1 (ANDERSEN et al., 2020). A subunidade S1 compreende os aminoácidos 14 a 685 (considerando que de 1 – 13 nós temos o peptídeo sinal que direciona a mesma ao retículo endoplasmático) e é composta por dois domínios: o Domínio N-terminal (NTD, aa 14 – 305), e o Domínio de Ligação ao Receptor (RBD, aa 319 - 541), sendo sua função, conseqüentemente, o reconhecimento do receptor e a ligação do vírus na superfície da célula em que este está prestes a infectar (LAN et al., 2020). A subunidade S2, por sua vez, compreende os aminoácidos 686 a 1273 e é formada pelo Peptídeo de Fusão (FP), pelos Heptad Repeats 1 e 2 (HR1 e HR2), pelo Domínio Transmembranar (TMD) e pela porção citoplásmica (CP). Os HRs e a porção TMD são responsáveis pela sustentação da estrutura da proteína e pela ancoragem dessa no envelope viral, enquanto o FP media o processo de fusão

do envelope viral na membrana da célula hospedeira ou na membrana do endossomo, a depender do processo de invasão disparado (WRAPP et al., 2020; CAI et al., 2020).

Para infectar uma célula, SARS-CoV-2 utiliza como receptor celular a também glicoproteína ACE2, enzima transmembranar componente do ciclo de regulação da pressão sanguínea Renina-Angiotensina-Aldosterona e responsável por converter angiotensina II em angiotensina 1-9 (DONOGHUE et al., 2000; YAN et al., 2020). ACE2 é uma proteína produzida por diversos órgãos e tecidos e encontra-se majoritariamente nos pulmões, córnea, rins e coração (SUN et al., 2020), fato que, em partes, explica o tropismo de SARS-CoV-2 para estes órgãos.

Além da clivagem em S1/S2, a proteína S passa por mais dois outros tipos de modificação pós-traducional extremamente importantes para sua estrutura/função. Uma dessas modificações ocorre durante o processo de fusão do envelope viral com a membrana celular e corresponde a mais uma clivagem, desta vez na região conhecida como S2' (BESTLE et al., 2020). Essa segunda clivagem libera o peptídeo de fusão e é mediada pela protease membrana TMPRSS2, ativando os eventos de fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática e garantindo a invasão do vírus (HOFFMANN et al., 2020). O terceiro tipo de modificação corresponde a suas glicosilações.

A extensa presença de carboidratos em proteínas de superfície de vírus patógenos de mamíferos é um fato bem conhecido (VIGERUST; SHEPHERD, 2007). A glicosilação de múltiplos sítios na proteína *Spike* de SARS-CoV-2 já era esperada antes mesmo da publicação das primeiras estruturas experimentais, uma vez que tanto SARS-CoV-1 quanto MERS-CoV, bem como diversos outros coronavírus, possuem uma elevada carga de glicídios em suas proteínas S (CHO et al., 2021). Conhecer a localização e a composição destes carboidratos é essencial se desejamos entender aspectos biológicos do vírus, como sua estrutura, sua capacidade infectiva e a evasão do sistema imune proporcionada pelos açúcares (BAGDONAITE; WANDALL, 2018).

Quando as primeiras sequências genômicas de SARS-CoV-2 foram publicadas, 22 sítios de N-glicosilação foram preditos na proteína S, e todos eles foram experimentalmente confirmados (WATANABE et al., 2020). Além das N-glicosilações, também foram identificados alguns O-glicopeptídeos em menor extensão (SHAJAHAN et al., 2020; SANDA; MORRISON; GOLDMAN, 2021). Os principais açúcares detectados como componentes dos glicanos da *Spike* são a hexose, a fucose, a galactose, o ácido siálico, a N-acetilglicosamina, a manose e a N-acetilgalactosamina, que formam estruturas com alto teor de manose, híbridas, complexas, dentre outras. A distribuição das glicosilações ao longo da proteína S não é homo-

gênea, estando elas concentradas na subunidade S1 (exceto o RBD), e no entorno do HR2, como pode ser observado na Figura 3B (WATANABE et al., 2020; SHAJAHAN et al., 2020; ZHANG et al., 2021; SANDA, MORRISON; GOLDMAN, 2021).

É interessante ressaltar que, assim como a composição de aminoácidos da glicoproteína *Spike* não é fixa e se altera conforme o vírus adquire mutações em seu genoma, a composição de carboidratos também não é fixa. Esse fato se deve a basicamente três mecanismos: (1) a própria variação na sequência de aminoácidos pode alterar a posição de sítios favoráveis a ação de transferases; (2) estes sítios não necessariamente serão ocupados em 100% das vezes; e (3) a ocupação deles pode variar entre diversos carboidratos diferentes, o que já foi observado (XU et al., 2020; ZHANG et al., 2021; SANDA, MORRISON; GOLDMAN, 2021). Essa variação também impacta diretamente na imunidade gerada contra a proteína S e deve ser levada em consideração se desejamos aplicar essa estrutura, bem como sítios específicos da mesma, em formulações vacinais e plataformas para avaliar a resposta imunológica gerada. Como discutido acima, essas glicosilações possuem diversos propósitos que ainda se encontram sob investigação.

1.3 Epítomos de Célula B: estrutura, predição e aplicações

Por ser a porta de entrada do vírus na célula hospedeira, a proteína *Spike* tem recebido atenção especial quanto ao desenvolvimento de vacinas, tratamentos e métodos diagnósticos que visam tentar mitigar a pandemia e seus efeitos (KRAMMER, 2020; BROWN; MCCULLOUGH, 2020). Diversos estudos que acompanharam pacientes recuperados da doença identificaram vários anticorpos neutralizantes direcionados contra vários epítomos na proteína S (LIU et al., 2020; WAJNBERG et al., 2020; BARNES et al., 2020). Quando um anticorpo reconhece e se liga a um antígeno, a região específica a partir da qual são formadas as interações entre o paratopo do anticorpo e o epítopo do antígeno é chamada de determinante antigênico ou epítopo de célula B (POTOCNAKOVA; BHADE; PULZOVA, 2016).

Epítomos de célula B são estruturas com potencial aplicação no desenvolvimento de novas vacinas, na produção de anticorpos recombinantes, no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos ou mesmo na pesquisa científica para caracterizar a resposta imune contra determinada estrutura imunogênica (SANCHEZ-TRINCADO; GOMES-PEROSANZ; RECHE, 2017; LIU; SHI; LI, 2020). Existem dois tipos de epítomos de célula B: os epítomos line-

ares, formados por resíduos de aminoácidos que se apresentam de forma sequencial na estrutura primária da proteína, e os epítomos conformacionais, formados por aminoácidos que se encontram distantes na estrutura primária da proteína, mas são trazidos para perto uns dos outros pelo *fold*ing da mesma e permanecem neste estado pelas interações intracadeia polipeptídica (SANCHEZ-TRINCADO; GOMES-PEROSANZ; RECHE, 2017).

Dada sua importância e aplicabilidade, um dos grandes desafios da imunologia foi tentar prever, de forma acurada, quais resíduos de aminoácidos ou regiões de uma proteína fazem parte de um epítomo de célula B, e diversas ferramentas computacionais foram desenvolvidas para tal (POTOCNAKOVA; Bhide; PULZOVA, 2016). A predição de epítomos lineares é a que concentra a maior parte dos métodos, mesmo que estes epítomos representem apenas cerca de 10% do total de epítomos de célula B, entretanto, algumas vantagens de se trabalhar com epítomos lineares podem ser citadas, como a relativa fácil obtenção dos mesmos através de estratégias de síntese de peptídeos e de biologia molecular, o que otimiza sua aplicação no desenvolvimento de imunizantes e testes diagnósticos, além da possibilidade de reconhecimento por anticorpos mesmo com a desnaturação do epítomo, uma vez que estes estarão direcionados para a sequência e não para a distribuição espacial dos mesmos, o que não é verdadeiro para epítomos conformacionais (VAN REGENMORTEL, 2009; SANCHEZ-TRINCADO; GOMES-PEROSANZ; RECHE, 2017).

Os primeiros métodos para predição de epítomos lineares se baseavam em escalas de propensão e probabilidade de determinado aminoácido ser ou não parte de um epítomo de célula B de acordo com suas características físico-químicas como flexibilidade, hidrofobicidade, acessibilidade superficial, e/ou de acordo com a frequência estatística de aparecimento do resíduo em epítomos experimentalmente validados, como é o caso do método de Kolaskar & Tongaonkar e do método PREDITOP (PELLEQUER; WESTHOF, 1993; KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990; SANCHEZ-TRINCADO; GOMES-PEROSANZ; RECHE, 2017). Alguns trabalhos foram desenvolvidos para validar a acurácia de predição destes métodos e todos concluem que se basear em escalas de propensão apenas traz resultados pobres e ligeiramente superiores à escolha randômica entre epítomos e não epítomos (BLYTHE; FLOWER, 2005; ANSARI; RAGHAVA, 2013; SANCHEZ-TRINCADO; GOMES-PEROSANZ; RECHE, 2017).

No intuito de melhorar a capacidade de predição, novos métodos baseados em inteligência artificial e aprendizado de máquina foram introduzidos. A ideia geral por trás destes algoritmos é, em primeiro lugar, obter bancos de dados contendo epítomos e não epítomos validados experimentalmente, seja por técnicas bioquímicas, imunológicas ou estruturais, e então

parametrizar as características básicas destes epítomos para que as mesmas possam ser utilizadas no treinamento de algoritmos de aprendizado de máquina (ANSARI; RAGHAHA, 2013). Aplicações como BepiPred, BepiPred 2.0, ABCpred, Bcepred, iBCE-EL e DLBEpitope foram desenvolvidas, validadas e gratuitamente disponibilizadas através de servidores *web* para serem utilizadas pela comunidade científica (SAHA; RAGHAHA, 2004; LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006; SAHA; RAGHAHA, 2006; JESPERSEN et al., 2017; MANAVALAN et al., 2018; LIU; SHI; LI, 2020).

Mesmo com a melhora na acurácia de predição obtida pela implementação da inteligência artificial, o uso dessas ferramentas de forma isolada, apesar de válido, deve ser considerado com cautela. Epítomos são estruturas tão ou mais complexas quanto seus antígenos originários e carregam características únicas em termos de composição, estrutura e propriedades. Ter como alvo apenas a estrutura primária do antígeno significa deixar de lado uma porção grande e importante das características inerentes à esse alvo, como é o caso da glicoproteína *Spike*. Informações relacionadas à estrutura, interações intra e intermoleculares, modificações pós-traducionais e ao comportamento dinâmico podem ser perdidas, mesmo sendo determinantes em processos bioquímicos como o reconhecimento antígeno-anticorpo (MARIUZZA; PHILLIPS; POLJAK, 1987; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2022).

1.4 Estudos atomísticos de Dinâmica Molecular

Sistemas biomoleculares não são estáticos, eles se movimentam ao longo do tempo de acordo com as forças que são exercidas sobre os mesmos. Determinar e analisar o movimento de uma biomolécula na escala atômica é de extrema importância se desejamos entender mais detalhes sobre sua estrutura e função, pois esse movimento molecular é inerente a todos os processos físicos e químicos em que o sistema está envolvido (KLEPEIS et al., 2009; OLIVEIRA, 2013). O movimento dinâmico de um sistema biomolecular pode ser estudado através de experimentos de Dinâmica Molecular (MD). As simulações de MD empregam algoritmos desenvolvidos para calcular a evolução dinâmica de cada átomo do sistema ao longo do tempo, ou seja, mapear sua trajetória baseada nas forças aplicadas e nas interações permitidas entre os átomos, descritas matematicamente pelos chamados Campos de Força (GONZÁLEZ, 2011).

O primeiro requisito e muitas vezes o mais difícil de se obter para um estudo atomístico de MD é a descrição detalhada e de qualidade das posições iniciais de cada átomo componente da biomolécula (ou sistema) que se deseja estudar. Essas coordenadas podem ser determinadas por técnicas experimentais de biologia estrutural como Cristalografia por Difração de Raios-X, Ressonância Magnética Nuclear (NMR), Microscopia Crioelétrica (Cryo-EM), dentre outras, ou por estratégias de bioinformática, como Modelagem por Homologia, e etc. O segundo requisito são as velocidades iniciais, atribuídas a partir da temperatura que selecionamos para nossos experimentos e distribuídas aleatoriamente entre os átomos do sistema via aproximação de Maxwell-Boltzmann (MOTTIN, 2015).

Tendo em mãos as coordenadas iniciais $\vec{r}_i(t=0)$ e as velocidades iniciais $\vec{v}_i(t=0)$ de cada átomo do sistema, e estabelecendo um Campo de Força que descreve como estes irão interagir entre si e como a energia potencial será distribuída dentro da caixa de simulação, calculam-se a força e a aceleração individual dos átomos seguindo a segunda Lei de Newton:

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i \quad (1)$$

que também podem ser escrita como:

$$\vec{a}_i = \frac{\vec{F}_i}{m_i} \quad (1.1)$$

Uma vez que a aceleração instantânea do átomo i \vec{a}_i , nada mais é que a derivada de sua velocidade instantânea \vec{v}_i , e que esta é a derivada da posição \vec{r}_i do átomo i no tempo t , a equação (1) pode ser reescrita como:

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} \quad (2)$$

Tendo em vista que a equação (2) é uma equação diferencial, sua solução pode ser obtida através da integração da mesma, entretanto, como não é possível determinar estes parâmetros para todos os possíveis intervalos de tempo, é necessário integrar através de diferenças finitas, uma vez que os experimentos de dinâmica molecular acontecem em pequenos passos de tempo Δt , na ordem dos femtosegundos, logo, uma integração numérica deve ser aplicada em cada um deles (OLIVEIRA, 2013). O algoritmo de Verlet é um dos métodos mais amplamente utilizados na integração numérica por diferenças finitas das equações do movimento em simulações de MD (VERLET, 1967). Com o método de Verlet, chegamos às seguintes aproximações para o cálculo das velocidades e acelerações (equação 3), e das posições (equação 4):

$$\vec{v}_i(t+\Delta t) = \vec{v}_i(t) + \vec{a}_i(t) \cdot \Delta t \quad (3)$$

$$\vec{r}_i(t+\Delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i(t)\cdot\Delta t + \frac{\vec{a}(t)\cdot\Delta t^2}{2} \quad (4)$$

Uma vez estabelecidas essas relações, a cada novo passo tempo Δt é possível atualizar as posições (\vec{r}_i), velocidades (\vec{v}_i) e acelerações (\vec{a}_i) dependentes do tempo para o átomo i com base no passo anterior $t + \Delta t$. O cálculo é repetido durante o decorrer da simulação, e com o conjunto destes dados salvos em intervalos regulares temos o resultado de todo experimento de MD: a trajetória dos átomos do sistema em relação ao tempo.

É imprescindível ressaltar que a trajetória gerada é nossa amostragem do sistema, portanto, esta deve possuir uma extensão temporal adequada para as análises propostas, para que a evolução dinâmica de nosso sistema calculada permita que este visite um conjunto representativo das configurações/conformações possíveis dentro dos parâmetros especificados (Campo de Força, sistema solvente, íons, presença de outras moléculas, etc) (OLIVEIRA, 2013). Por fim, com a trajetória em mãos, é possível calcular algumas propriedades macroscópicas observáveis do sistema através de aproximações da mecânica estatística, uma vez que, como já comentado, as forças resultantes agindo sobre o sistema podem ser descritas como uma função da energia potencial do sistema, de acordo com a equação:

$$\vec{F}_i = -\nabla_i U(\vec{r}_1(t), \vec{r}_2(t), \dots, \vec{r}_n(t)) \quad (5)$$

onde \vec{F}_i representa a força resultante agindo sobre o átomo i , e $-\nabla_i U(\vec{r}_1(t), \vec{r}_2(t), \dots, \vec{r}_n(t))$ representa o gradiente da energia potencial U do sistema em estudo, em relação as coordenadas do átomo i , que é função das posições de todos os átomos que o compõe. Nota-se que esse gradiente é negativo pois a energia potencial está sendo aplicada através das forças agindo sobre os átomos do sistema para desencadear seu movimento.

Em nosso estudo, foi empregado o *software* Amber 2018, que reúne um conjunto de diferentes programas e ferramentas voltados para a simulações atomísticas via mecânica molecular e mecânica quântica. No Amber é possível escolher entre uma miríade de diferentes campos de força para experimentos com moléculas orgânicas, inorgânicas e biomoléculas (DNA, RNA, carboidratos, lipídeos e proteínas) em vários sistemas solventes. Para distribuir a energia potencial através das diferentes interações permitidas entre os átomos do sistema, um campo de força interpretado pelo Amber deve, ao menos, especificar parâmetros ligados da mecânica molecular e não ligados, sendo estes últimos baseadas nos potenciais Coulumbicos e de Lennard-Jones, normalmente otimizadas a partir de dados experimentais de química

quântica (SALOMON-FERRER; CASE; WALKER, 2012). Neste sentido, a energia potencial $E(\vec{r}_i)$ relacionada ao átomo i em determinada coordenada \vec{r}_i é definida em termos de:

$$E(\vec{r}_i) = E_{\text{Ligação}} + E_{\text{Torção}} + E_{\text{Angular}} + E_{\text{Não-ligada}} \quad (6)$$

ou seja, ela é dependente das energias de ligação, de torção (diédrica), angular e não-ligada entre o átomo i e os outros átomos do sistema. Em azul nós temos os termos ligados e em vermelho o termo não-ligado (que engloba o potencial Coulumbico e o de Lennard-Jones). Cada uma das energias acima pode ser decomposta matematicamente de acordo com as equações:

$$E_{\text{Ligação}} = \sum_{\text{Ligações}} \frac{k_b}{2} (r - r_0)^2 \quad (6.1)$$

$$E_{\text{Torção}} = \sum_{\text{Torções}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma_1)] \quad (6.2)$$

$$E_{\text{Angular}} = \sum_{\text{Ângulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (6.3)$$

$$E_{\text{Não ligada}} = \sum_{i>j} f_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (6.4)$$

Um protocolo típico de simulação por Dinâmica Molecular consiste em preparar a(s) biomolécula(s) alvo e a caixa de simulação, minimizar a energia do sistema, equilibrar a temperatura, e por fim calcular a trajetória (GELPI et al, 2015). A primeira etapa muito dependerá da origem da estrutura alvo. Aqui, átomos/*loops* ausentes devem ser posicionados/modelados, as cargas devem ser precisamente distribuídas entre os átomos, a caixa periódica deve ser criada com uma dimensão adequada ao sistema em estudo, o solvente, íons e demais moléculas devem ser adicionados. No Amber, esta etapa pode ser feita empregando o módulo *tleap* (SALOMON-FERRER; CASE; WALKER, 2012). A minimização de energia é uma etapa crucial para remover as tensões e restrições conformacionais do alvo que se originam de acordo com o método aplicado na obtenção das coordenadas atômicas, sendo características destes, uma vez que a determinação da estrutura ocorre, em grande parte das vezes, em condições não fisiológicas (LINDAHL, 2015). Para minimizar a energia, o algoritmo de MD irá calcular o gradiente da energia potencial do sistema até que seja atingido um mínimo local (JAABEN; MOHAMEDALI; RANGANATHAN, 2019). Por fim, logo antes de iniciarmos nossa simulação, a equilibração da temperatura (ou termalização do sistema) visa levarmos nosso sistema até um ponto próximo ao estado de equilíbrio termodinâmico, ou seja, conduzi-lo gradativamente a uma conformação favorável em determinada temperatura e pressão (OLIVEIRA, 2013). Isso é feito aplicando um sistema barostato/termostato que irá aumentar gradativamen-

te a temperatura dentro da caixa de simulação (até a temperatura desejada), em condições NVT (com volume constante), permitindo que o alvo alcance o equilíbrio sem fortes distorções conformacionais ocasionadas por má distribuição de energia em pontos específicos do sistema.

Tendo em mãos um sistema corretamente preparado, com energia minimizada e temperatura equilibrada, inicia-se a produção da dinâmica, e para isto basta aplicar o método escolhido para a integração numérica das equações do movimento e salvar periodicamente as posições (\vec{r}_i), velocidades (\vec{v}_i) e acelerações (\vec{a}_i) dependentes do tempo para construir a trajetória. Esta etapa normalmente é feita em condições NTP (com pressão e temperatura constantes). Finalizada a etapa de produção da MD, a trajetória deve ser analisada e os parâmetros relevantes ao trabalho calculados. No presente estudo, buscamos avaliar propriedades bioquímicas/biofísicas dos epítopos que são relevantes ao processo de reconhecimento molecular entre o paratopo de um anticorpo e o epítipo do antígeno e que podem ter um papel crucial na capacidade dos mesmos de induzir uma resposta de célula B e serem bons alvos para a detecção de anticorpos anti-S.

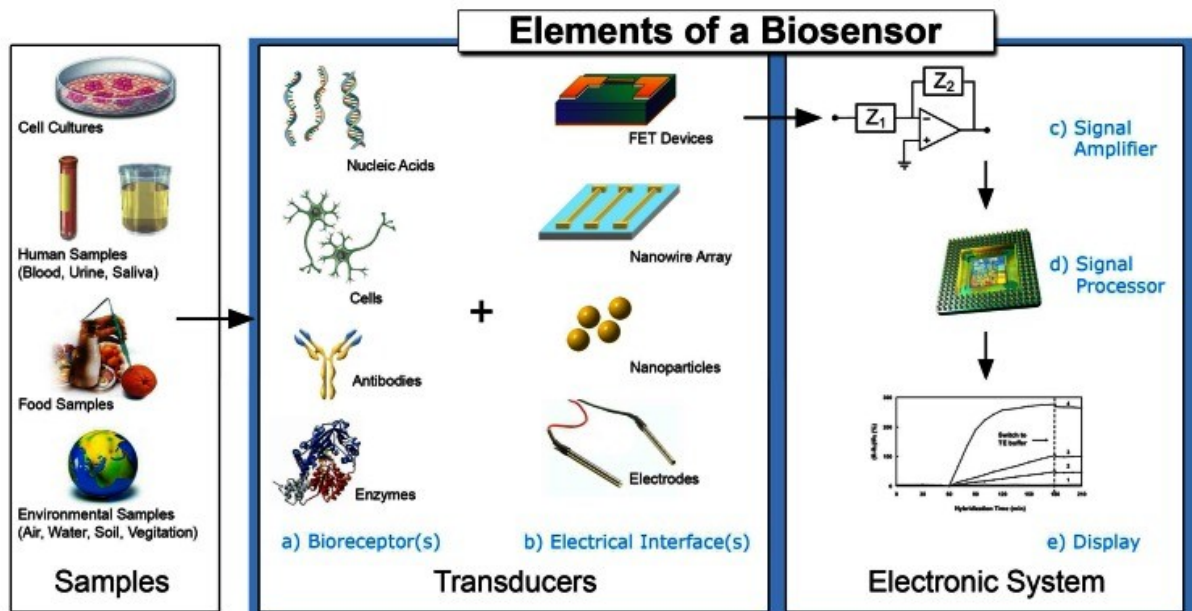
1.5 Biossensores e suas aplicações

Detectar e quantificar componentes e processos biológicos é uma tarefa de extrema importância para as ciências biomédica e biotecnológica, entretanto, converter uma informação biológica em um sinal observável é considerada uma atividade desafiadora, especialmente devido à complexidade em se interfacear um componente eletrônico/óptico a um ambiente biológico (GRIESHABER et al., 2008). Um biossensor é justamente o dispositivo analítico capaz de fazer esta ponte, responsável por converter determinada informação biológica em sinal detectável (LOWE, 1984). Para funcionar, um biossensor depende da conexão de diversos componentes, ilustrados na Figura 4 abaixo. Os principais são:

1. a unidade receptora, capaz de interagir com o analito de interesse presente na amostra biológica;

2. a interface elétrica, composta de materiais como polímeros, nanopartículas e nanoestruturas metálicas, e com arquitetura específica onde ocorrerá um evento biológico capaz de emitir um sinal mensurável;
3. o elemento transdutor, onde o sinal gerado na etapa anterior será amplificado e convertido em sinal eletrônico por um circuito presente no equipamento de leitura;
4. o software que irá compilar, processar e plotar os dados obtidos (GRIESHABER et al., 2008).

Figura 4. Elementos básicos de um Biossensor. No primeiro quadro, há destaque para alguns exemplos de amostras para as quais os biossensores podem ser aplicados. No segundo e terceiro quadros, temos exemplos de unidades receptoras (a), de interfaces elétricas (b), amplificadores (c), processadores (d) e interfaces gráficas para exibição do(s) sinal(is) gerado(s) (e).



Fonte: GRIESHABER et al., 2008.

Um exemplo de grande sucesso dos biossensores é o sensor destinado à aferição da glicemia capilar. Medir com precisão os níveis sanguíneos de glicose é um procedimento extremamente importante para prevenção, diagnóstico e tratamento da Diabetes Mellitus, doença crônica caracterizada pelos níveis elevados e sustentados de açúcar no sangue devido a falta de produção do hormônio insulina (Tipo I) ou a resistência dos tecidos periféricos em responder à seus estímulos (Tipo II) (COLE; FLOREZ, 2020). A grande maioria dos biossensores destinados a esse fim utilizam o método eletroquímico baseado na atividade de enzimas como a glicose desidrogenase (GDH) ou a glicose oxidase (GOx), imobilizadas na superfície de um eletrodo. Quando a glicose está presente na amostra, sua oxidação gera um fluxo de elétrons que é detectado e amplificado pelo sistema. Como esse fluxo é diretamente proporci-

onal à concentração de glicose, é possível inferir sobre os níveis presentes na amostra (YOO; LEE, 2010). Gigantes farmacêuticas como a Abbott Laboratories e a divisão diagnóstica da Hoffmann–La Roche têm participação importante neste mercado (HWANG et al., 2018).

Dentro do universo dos biossensores existem os imunossensores, onde a unidade receptora imobilizada na superfície do transdutor é um antígeno ou um anticorpo, e a detecção do analito se baseia na interação dos mesmos. Antígenos e anticorpos são biomoléculas que possuem altíssima afinidade entre si, na faixa de $K_d = 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, e se aproveitar deste fato permite o desenvolvimento de sensores para uma ampla gama de aplicações que vão desde o diagnóstico clínico à pesquisa científica e aplicações industriais (vide abaixo). A imobilização de antígenos e anticorpos é possível em muitos materiais transdutores, o que garante diferentes formas de detecção do sinal gerado, com destaque para os imunossensores eletroquímicos (AIZAWA, 1991; KARUNAKARAN; PANDIARAJ; SANTHARAMAN, 2015).

Estes sensores possuem grande notoriedade pois somam a elevada sensibilidade das análises eletroquímicas com a elevada seletividade das interações antígeno-anticorpo. Os imunossensores eletroquímicos apresentam diversas vantagens como sua versatilidade e simplicidade de uso, uma vez que eles dispensam a necessidade de estruturas laboratoriais complexas e o operador pode fazer medições em praticamente qualquer lugar, os dados podem ser processados diretamente por meio de conexões com um telefone celular ou com um dispositivo simples, os resultados tendem a ser emitidos rapidamente usando pequenos volumes de amostras (na faixa dos microlitros), com elevadas sensibilidade e especificidade, e custo acessível (RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002; AYDIN; AYDIN; SEZGINTÜRK, 2019; CASTILHO, 2022).

Algumas aplicações de destaque para os imunossensores eletroquímicos:

- Detecção de Aflatoxina B1 em amostras de azeite de oliva (YU et al., 2015);
- Diagnóstico de Câncer de Ovário pela detecção antígeno CA-125 (GASPAROTTO et al., 2017);
- Diagnóstico simultâneo da Doença de Chagas e da Leishmaniose Visceral pela detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania infantum* (CORDEIRO et al., 2020);
- Diagnóstico de Hepatite C pela detecção direta do Vírus da Hepatite C (HCV) em amostra de soro (COSTA et al., 2019);
- Detecção da bactéria patogênica *Salmonella typhimurium* (SALAM; TOTHILL, 2008);

- Detecção de atrazina, um herbicida tóxico para seres humanos e animais em amostras ambientais (IONESCU et al., 2010);

Exemplificar tais aplicações é, na melhor das hipóteses, arranhar a superfície do vasto universo de aplicações e variações dos imunossensores eletroquímicos. Uma vez mapeados e caracterizados os epítomos antigênicos da proteína S, o último passo do trabalho foi testar uma plataforma baseada em sensores imunoeletroquímicos para a detecção de anticorpos anti-S.

1.6 Justificativa

Identificar com acurácia epítomos individuais em estruturas antigênicas é um processo exaustivo porém essencial para caracterizarmos novas doenças e a resposta imune associada, sendo o ponto de partida para o desenvolvimento de novas formas de prevenção, tratamentos e condutas clínicas. Dado que a pandemia de COVID-19, causada pelo vírus respiratório SARS-CoV-2, atingiu violentamente o Brasil e ocasionou irreparáveis perdas humanas, sociais e econômicas, uma resposta eficaz quanto ao manejo dos pacientes e ao desenvolvimento e distribuição de novas vacinas, bem como a avaliação da cobertura vacinal através da caracterização laboratorial da resposta anti-SARS-CoV-2 foi, permanece e será essencial.

Dado o *knowhow* de nosso grupo de pesquisa no desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico sorológico e molecular de doenças virais, como a Hepatite C (KENFE et al., 2013; BIASOTO et al., 2019; COSTA et al., 2019), e considerando o exposto nesta breve introdução, o presente trabalho buscou testar um método combinatório utilizando algoritmos de predição de epítomos lineares de célula B que utilizem inteligência artificial para selecionar os provável epítomos presentes na proteína *Spike*; caracterizar estes sítios através de experimentos de Dinâmica Molecular; obtê-los via síntese orgânica de peptídeos e por fim aplicá-los no desenvolvimento de novas plataformas inovadoras baseadas em sensores eletroquímicos baratos e de alta sensibilidade tanto para a triagem de pacientes recém ou previamente infectados, quanto para a avaliação da resposta imunológica produzida por vacinas experimentais.

6 CONCLUSÕES

- A partir da estratégia combinatória para predição de epítomos lineares de célula B proposta e testada no trabalho, 13 potenciais sítios imunodominantes foram encontrados na glicoproteína *Spike*;
- Com análises de bioinformática complementares, foi possível avaliar a identidade estrutural destes sítios frente a proteína S de SARS-CoV-1 e de MERS-CoV, além do acúmulo de mutações em decorrência do surgimento das variantes do vírus (Apêndice E);
- Com os experimentos atomísticos de Dinâmica Molecular, dentro das limitações do método e de nosso poder computacional, foi possível caracterizar propriedades bioquímicas e biofísicas importantes ao processo de interação antígeno-anticorpo que são inerentes aos epítomos preditos, e com isso avaliar quais seriam os melhores alvos para a validação experimental;
- Os epítomos E7, E8, E9 e Controle foram satisfatoriamente obtidos pela estratégia de SPSS implementada e validada no laboratório, sendo a identidade molecular dos produtos de síntese confirmada por Espectrometria de Massas e o perfil cromatográfico dos epítomos Controle e E7 obtido via HPLC;
- O epítomo E7 foi satisfatoriamente aplicado na validação inicial da plataforma de detecção de anticorpos anti-S em biossensor imunoeletróquímico com resultados preliminares promissores;

7 PERSPECTIVAS

- Obter os perfis cromatográficos dos epítopos E8 e E9;
- Purificar, quando necessário, os epítopos sintetizados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC) semipreparativa;
- Avaliar a estrutura global em solução dos peptídeos sintetizados através de Dicroísmo Circular;
- Funcionalizar mais sensores e realizar as medições com mais replicadas e com significância estatística;

8 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology. 10th ed. Amsterdam: Elsevier Health Sciences Division, 2022.
- AIZAWA, M. Principles and applications of electrochemical and optical biosensors. **Analytica Chimica Acta**, vol. 250, p. 249–256, Oct. 1991. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(91\)85073-2](https://doi.org/10.1016/0003-2670(91)85073-2).
- ANDERSEN, K. G.; RAMBAUT, A.; LIPKIN, W. I.; HOLMES, E. C.; GARRY, R. F. The Proximal Origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, vol. 26, p. 450–452, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>.
- ANSARI, H. R.; RAGHAVA, G. P. S. In Silico Models for B-Cell Epitope Recognition and Signaling. **Methods in Molecular Biology**, vol. 993, p. 129–138, 2013. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-342-8_9.
- AYDIN, E. B.; AYDIN, M.; SEZGINTÜRK, M. K. Advances in electrochemical immunosensors. **Advances in Clinical Chemistry**, p. 1–57, 2019. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.04.006>.
- BAGDONAITE, I.; WANDALL, H. H. Global aspects of viral glycosylation. **Glycobiology**, vol. 28, no. 7, p. 443–467, Mar. 2018. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy021>.
- BARNES, C. O.; JETTE, C. A.; ABERNATHY, M. E.; DAM, K.-M. A.; ESSWEIN, S. R.; GRISTICK, H. B.; MALYUTIN, A. G.; SHARAF, N. G.; HUEY-TUBMAN, K. E.; LEE, Y. E.; ROBBIANI, D. F.; NUSSENZWEIG, M. C.; WEST, A. P.; BJORKMAN, P. J. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. **Nature**, vol. 588, p. 682–687, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2852-1>.
- BELOUZARD, S.; CHU, V. C.; WHITTAKER, G. R. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 106, no. 14, p. 5871–5876, Mar. 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809524106>.
- BEHRENDT, R.; WHITE, P.; OFFER, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. **Journal of Peptide Science**, vol. 22, no. 1, p. 4–27, Jan. 2016. <https://doi.org/10.1002/psc.2836>.
- BESTLE, D.; HEINDL, M. R.; LIMBURG, H.; VAN LAM VAN, T.; PILGRAM, O.; MOULTON, H.; STEIN, D. A.; HARDES, K.; EICKMANN, M.; DOLNIK, O.; ROHDE, C.;

KLENK, H.-D.; GARTEN, W.; STEINMETZER, T.; BÖTTCHER-FRIEBERTSHÄUSER, E. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. **Life Science Alliance**, vol. 3, no. 9, p. e202000786, Jul. 2020. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000786>.

BIASOTTO, G.; COSTA, J. P. C.; COSTA, P. I.; ZAGHETE, M. A. ZnO nanorods-gold nanoparticle-based biosensor for detecting hepatitis C. **Applied Physics A**, vol. 125, no. 12, p. 1–7, Nov. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00339-019-3128-1>.

BLYTHE, M. J.; FLOWER, D. R. Benchmarking B cell epitope prediction: Underperformance of existing methods. **Protein Science**, vol. 14, no. 1, p. 246–248, Jan. 2009. <https://doi.org/10.1110/ps.041059505>.

BODANSZKY, M. Principles of Peptide Synthesis. Berlin: Heidelberg Springer, 1984.

BRASIL. Painel Coronavírus. Mar. 2022. Available at: <https://covid.saude.gov.br/>. Accessed on: 15 Mar. 2022.

BROWN, B. L.; MCCULLOUGH, J. Treatment for emerging viruses: Convalescent plasma and COVID-19. **Transfusion and Apheresis Science**, vol. 59, no. 3, Apr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102790>.

BUI, H.-H.; SIDNEY, J.; LI, W.; FUSSEDER, N.; SETTE, A. Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. **BMC Bioinformatics**, vol. 8, no. 1, Sep. 2007. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-361>.

CAI, Y.; ZHANG, J.; XIAO, T.; PENG, H.; STERLING, S. M.; WALSH, R. M.; RAWSON, S.; RITS-VOLLOCH, S.; CHEN, B. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. **Science**, vol. 369, no. 6511, p. 1586–1592, Jul. 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abd4251>.

CHAN, J. F.-W.; KOK, K.-H.; ZHU, Z.; CHU, H.; TO, K. K.-W.; YUAN, S.; YUEN, K.-Y. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes & Infections**, vol. 9, no. 1, p. 221–236, Jan. 2020. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>.

CHENG, Y.-W.; CHAO, T.-L.; LI, C.-L.; CHIU, M.-F.; KAO, H.-C.; WANG, S.-H.; PANG, Y.-H.; LIN, C.-H.; TSAI, Y.-M.; LEE, W.-H.; TAO, M.-H.; HO, T.-C.; WU, P.-Y.; JANG, L.-T.; CHEN, P.-J.; CHANG, S.-Y.; YEH, S.-H. Furin Inhibitors Block SARS-CoV-2 Spike Pro-

tein Cleavage to Suppress Virus Production and Cytopathic Effects. **Cell Reports**, vol. 33, no. 2, p. 108254, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108254>.

CHI, X.; YAN, R.; ZHANG, J.; ZHANG, G.; ZHANG, Y.; HAO, M.; ZHANG, Z.; FAN, P.; DONG, Y.; YANG, Y.; CHEN, Z.; GUO, Y.; ZHANG, J.; LI, Y.; SONG, X.; CHEN, Y.; XIA, L.; FU, L.; HOU, L.; XU, J. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. **Science**, vol. 369, no. 6504, p. 650–655, Jun. 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abc6952>.

BIASOTTO, G.; COSTA, J. P. C.; COSTA, P. I.; ZAGHETE, M. A. ZnO nanorods-gold nanoparticle-based biosensor for detecting hepatitis C. **Applied Physics A**, vol. 125, no. 12, Nov. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00339-019-3128-1>.

CASTILHO, B. M. Identificação, caracterização e síntese peptídica associada à enolase de *Sporothrix schenckii*: aplicação em plataforma imunossensora eletroquímica portátil para o diagnóstico da Esporotricose Felina. 2022. Thesis – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Campus Araraquara, 2022.

CHO, B. G.; GAUTAM, S.; PENG, W.; HUANG, Y.; GOLI, M.; MECHREF, Y. Direct Comparison of N-Glycans and Their Isomers Derived from Spike Glycoprotein 1 of MERS-CoV, SARS-CoV-1, and SARS-CoV-2. **Journal of Proteome Research**, vol. 20, no. 9, p. 4357–4365, Aug. 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00323>.

CHRISTENSEN, P. A.; OLSEN, R. J.; LONG, S. W.; SNEHAL, R.; DAVIS, J. J.; SAAVEDRA, M. O.; REPPOND, K.; SHYER, M. N.; CAMBRIC, J.; GADD, R.; THAKUR, R. M.; BATAJOO, A.; MANGHAM, R.; PENA, S.; TRINH, T.; KINSKEY, J. C.; WILLIAMS, G.; OLSON, R.; GOLLIHAR, J.; MUSSER, J. M. Signals of Significantly Increased Vaccine Breakthrough, Decreased Hospitalization Rates, and Less Severe Disease in Patients with Coronavirus Disease 2019 Caused by the Omicron Variant of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Houston, Texas. **The American Journal of Pathology (Preprint)**, Feb. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.01.007>.

COLE, J. B.; FLOREZ, J. C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. **Nature Reviews. Nephrology**, vol. 16, no. 7, p. 377–390, 12 May 2020. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>.

CORDEIRO, T. A. R.; MARTINS, H. R.; FRANCO, D. L.; SANTOS, F. L. N.; CELEDON, P. A. F.; CANTUÁRIA, V. L.; DE LANA, M.; REIS, A. B.; FERREIRA, L. F. Impedimetric

immunosensor for rapid and simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 169, p. 112573, Dec. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112573>.

CORMAN, V. M.; LANDT, O.; KAISER, M.; MOLENKAMP, R.; MEIJER, A.; CHU, D. K.; BLEICKER, T.; BRÜNINK, S.; SCHNEIDER, J.; SCHMIDT, M. L.; MULDER, D. G.; HAAGMANS, B. L.; VAN DER VEER, B.; VAN DEN BRINK, S.; WIJSMAN, L.; GORDERSKI, G.; ROMETTE, J.-L.; ELLIS, J.; ZAMBON, M.; PEIRIS, M. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, vol. 25, no. 3, Jan. 2020. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.3.2000045>.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 17, no. 3, p. 181–192, Dec. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.

COSTA, J. P.; BASTOS, W. B.; DA COSTA, P. I.; ZAGHETE, M. A.; LONGO, E.; CARMO, J. P. Portable Laboratory Platform With Electrochemical Biosensors for Immunodiagnostic of Hepatitis C Virus. **IEEE Sensors Journal**, vol. 19, no. 22, p. 10701–10709, Nov. 2019. <https://doi.org/10.1109/jsen.2019.2930957>.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. **Circulation Research**, vol. 87, no. 5, p. e1–e9, Sep. 2000. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1>.

FDA. FACT SHEET FOR HEALTH CARE PROVIDERS EMERGENCY USE AUTHORIZATION (EUA) OF REGEN-COV™ (casirivimab with imdevimab). [S. l.: s. n.], Jul. 2021. Available at: <https://www.fda.gov/media/145611/download>. Accessed on: 16 Mar. 2022.

FORNI, D.; CAGLIANI, R.; CLERICI, M.; SIRONI, M. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. **Trends in Microbiology**, vol. 25, no. 1, p. 35–48, Jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001>.

FRISHMAN, D.; ARGOS, P. Knowledge-based protein secondary structure assignment. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, vol. 23, no. 4, p. 566–579, Dec. 1995. <https://doi.org/10.1002/prot.340230412>.

GASPAROTTO, G.; COSTA, J. P. C.; COSTA, P. I.; ZAGHETE, M. A.; MAZON, T. Electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods-Au nanoparticles nanohybrids for ovarian cancer antigen CA-125 detection. **Materials Science and Engineering: C**, vol. 76, p. 1240–1247, Jul. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.031>.

GELPI, J.; HOSPITAL, A.; GOÑI, R.; OROZCO, M. Molecular dynamics simulations: advances and applications. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, vol. 8, p. 37–47, Nov. 2015. <https://doi.org/10.2147/aabc.s70333>.

GHORBANI, M.; BROOKS, B. R.; KLAUDA, J. B. Exploring dynamics and network analysis of spike glycoprotein of SARS-COV-2. **Biophysical Journal**, vol. 120, no. 14, p. 2902–2913, Mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.02.047>.

GONZÁLEZ, M. A. Force fields and molecular dynamics simulations. **École thématique de la Société Française de la Neutronique**, vol. 12, p. 169–200, Jun. 2011. <https://doi.org/10.1051/sfn/201112009>.

GUAN, W.; NI, Z.; HU, Y.; LIANG, W.; OU, C.; HE, J.; LIU, L.; SHAN, H.; LEI, C.; HUI, D. S. C.; DU, B.; LI, L.; ZENG, G.; YUEN, K.-Y.; CHEN, R.; TANG, C.; WANG, T.; CHEN, P.; XIANG, J.; LI, S. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, vol. 382, no. 18, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2002032>.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, vol. 8, no. 3, p. 1400–1458, Mar. 2008. <https://doi.org/10.3390/s80314000>.

HENDERSON, R.; EDWARDS, R. J.; MANSOURI, K.; JANOWSKA, K.; STALLS, V.; GOBEIL, S. M. C.; KOPP, M.; LI, D.; PARKS, R.; HSU, A. L.; BORGNIA, M. J.; HAYNES, B. F.; ACHARYA, P. Controlling the SARS-CoV-2 spike glycoprotein conformation. **Nature Structural & Molecular Biology**, vol. 27, no. 10, p. 925–933, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0479-4>.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; SCHROEDER, S.; KRÜGER, N.; HERRLER, T.; ERICHSEN, S.; SCHIERGENS, T. S.; HERRLER, G.; WU, N.-H.; NITSCHKE, A.; MÜLLER, M. A.; DROSTEN, C.; PÖHLMANN, S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, vol. 181, no. 2, p. 271–280, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.

- HUAN, Y.; KONG, Q.; MOU, H.; YI, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in Microbiology**, vol. 11, Oct. 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>.
- HUANG, C.; HUANG, L.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L.; GU, X.; KANG, L.; GUO, L.; LIU, M.; ZHOU, X.; LUO, J.; HUANG, Z.; TU, S.; ZHAO, Y.; CHEN, L.; XU, D.; LI, Y.; LI, C.; PENG, L.; LI, Y. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. **The Lancet**, vol. 397, no. 10270, p. 220–232, Jan. 2021. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32656-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32656-8).
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, vol. 14, no. 1, p. 33–38, Feb. 1996. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- HWANG, D.-W.; LEE, S.; SEO, M.; CHUNG, T. D. Recent advances in electrochemical non-enzymatic glucose sensors – A review. **Analytica Chimica Acta**, vol. 1033, p. 1–34, Nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.051>.
- IONESCU, R. E.; GONDRAN, C.; BOUFFIER, L.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MARTELLET, C.; COSNIER, S. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of atrazine. **Electrochimica Acta**, vol. 55, no. 21, p. 6228–6232, Aug. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.11.029>.
- JABEEN, A.; MOHAMEDALI, A.; RANGANATHAN, S. Protocol for protein structure modelling. *In*: RANGANATHAN, S.; NAKAI, K.; SCHÖNBACHC.; GRIBSKOV, M. (eds.). **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 252–272.
- JASSAT, W.; ABDOOL KARIM, S. S.; MUDARA, C.; WELCH, R.; OZOUGWU, L.; GROOME, M. J.; GOVENDER, N.; VON GOTTBURG, A.; WOLTER, N.; WOLMARANS, M.; ROUSSEAU, P.; BLUMBERG, L.; COHEN, C. Clinical severity of COVID-19 patients admitted to hospitals during the Omicron wave in South Africa. **medRxiv (Preprint)**, Feb. 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.02.22.21268475>.
- JESPERSEN, M. C.; PETERS, B.; NIELSEN, M.; MARCATILI, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Research**, vol. 45, no. W1, p. W24–W29, May 2017. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>.

JI, W.; WANG, W.; ZHAO, X.; ZAI, J.; LI, X. Homologous recombination within the spike glycoprotein of the newly identified coronavirus may boost cross-species transmission from snake to human. **Journal of Medical Virology**, vol. 92, no. 4, p. 433–440, Jan. 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.25682>.

JIANG, F.; DENG, L.; ZHANG, L.; CAI, Y.; CHEUNG, C. W.; XIA, Z. Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Journal of General Internal Medicine**, vol. 35, no. 5, p. 1545–1549, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11606-020-05762-w>.

JO, S.; KIM, T.; IYER, V. G.; IM, W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of Computational Chemistry**, vol. 29, no. 11, p. 1859–1865, Mar. 2008. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.

JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J. D.; IMPEY, R. W.; KLEIN, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, vol. 79, no. 2, p. 926–935, Jul. 1983. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.

KARUNAKARAN, C.; PANDIARAJ, M.; SANTHARAMAN, P. Immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 205–245, 2015. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803100-1.00004-9>.

KENFE, F. R.; URBACZEK, A. C.; SILVA, J. C.; NÉO, T. A.; DA SILVA, F. H.; DA COSTA, P. I. Development of diagnostic methods and study of the immunoreactivity of a mixture of recombinant core and E2 proteins fused to GST with control serum positive for hepatitis C. **Talanta**, vol. 110, p. 32–38, Jun. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.017>.

JU, B.; ZHANG, Q.; GE, J.; WANG, R.; SUN, J.; GE, X.; YU, J.; SHAN, S.; ZHOU, B.; SONG, S.; TANG, X.; YU, J.; LAN, J.; YUAN, J.; WANG, H.; ZHAO, J.; ZHANG, S.; WANG, Y.; SHI, X.; LIU, L. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. **Nature**, vol. 584, p. 115–119, May 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2380-z>.

KIRSCHNER, K. N.; YONGYE, A. B.; TSCHAMPEL, S. M.; GONZÁLEZ-OUTEIRIÑO, J.; DANIELS, C. R.; FOLEY, B. L.; WOODS, R. J. GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. Carbohydrates. **Journal of Computational Chemistry**, vol. 29, no. 4, p. 622–655, Sep. 2007. <https://doi.org/10.1002/jcc.20820>.

KLEPEIS, J. L.; LINDORFF-LARSEN, K.; DROR, R. O.; SHAW, D. E. Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function. **Current Opinion in Structural Biology**, vol. 19, no. 2, p. 120–127, Apr. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.03.004>.

KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Letters**, vol. 276, no. 1, p. 172–174, Dec. 1990. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80535-q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80535-q).

KRAMMER, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. **Nature**, vol. 586, p. 516–527, Sep. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>.

LAM, T. T.-Y.; SHUM, M. H.-H.; ZHU, H.-C.; TONG, Y.-G.; NI, X.-B.; LIAO, Y.-S.; WEI, W.; CHEUNG, W. Y.-M.; LI, W.-J.; LI, L.-F.; LEUNG, G. M.; HOLMES, E. C.; HU, Y.-L.; GUAN, Y. Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins. **Nature**, vol. 583, p. 282–285, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0>.

LAN, J.; GE, J.; YU, J.; SHAN, S.; ZHOU, H.; FAN, S.; ZHANG, Q.; SHI, X.; WANG, Q.; ZHANG, L.; WANG, X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, vol. 581, p. 215–220, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>.

LARSEN, J.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, vol. 2, no. 1, 2006. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2>.

LEE, S. Y.; HUR, S. J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. **Food Chemistry**, vol. 228, p. 506–517, Aug. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.039>.

LI, D.; SEMPOWSKI, G. D.; SAUNDERS, K. O.; ACHARYA, P.; HAYNES, B. F. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies for COVID-19 Prevention and Treatment. **Annual Review of Medicine**, vol. 73, no. 1, p. 1–16, Aug. 2021. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042420-113838>.

LI, F.; LI, W.; FARZAN, M.; HARRISON, S. C. Structure of SARS Coronavirus Spike Receptor-Binding Domain Complexed with Receptor. **Science**, vol. 309, no. 5742, p. 1864–1868, Sep. 2005. <https://doi.org/10.1126/science.1116480>.

LI, W. Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. **Science**, vol. 310, no. 5748, p. 676–679, Oct. 2005. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>.

LINDAHL, E. Molecular Dynamics Simulations. *In*: KUKOL, A. (ed.). **Molecular Modeling of Proteins. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**. New York, NY: Humana Press, 2015. p. 3–26.

LIU, Q.; WANG, J.; BOYD, B. J. Peptide-based biosensors. **Talanta**, vol. 136, p. 114–127, May 2015. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.020>.

LIU, T.; SHI, K.; LI, W. Deep learning methods improve linear B-cell epitope prediction. **Bio-Data Mining**, vol. 13, no. 1, Apr. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13040-020-00211-0>.

LOWE, C. R. Biosensors. **Trends in Biotechnology**, vol. 2, no. 3, p. 59–65, May 1984. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(84\)90011-8](https://doi.org/10.1016/0167-7799(84)90011-8).

LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; NIU, P.; YANG, B.; WU, H.; WANG, W.; SONG, H.; HUANG, B.; ZHU, N.; BI, Y.; MA, X.; ZHAN, F.; WANG, L.; HU, T.; ZHOU, H.; HU, Z.; ZHOU, W.; ZHAO, L.; CHEN, J. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, vol. 395, no. 10224, p. 565–574, Jan. 2020. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30251-8).

LYTRAS, S.; HUGHES, J.; MARTIN, D.; SWANEPOEL, P.; DE KLERK, A.; LOURENS, R.; KOSAKOVSKY POND, S. L.; XIA, W.; JIANG, X.; ROBERTSON, D. L. Exploring the Natural Origins of SARS-CoV-2 in the Light of Recombination. **Genome Biology and Evolution**, vol. 14, no. 2, Feb. 2022. <https://doi.org/10.1093/gbe/evac018>.

MAIER, J. A.; MARTINEZ, C.; KASAVAJHALA, K.; WICKSTROM, L.; HAUSER, K. E.; SIMMERLING, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. **Journal of Chemical Theory and Computation**, vol. 11, no. 8, p. 3696–3713, Jul. 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>.

MANAVALAN, B.; GOVINDARAJ, R. G.; SHIN, T. H.; KIM, M. O.; LEE, G. iBCE-EL: A New Ensemble Learning Framework for Improved Linear B-Cell Epitope Prediction. **Frontiers in Immunology**, vol. 9, Jul. 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01695>.

MARIUZZA, R. A.; PHILLIPS, S. E. V.; POLJAK, R. J. The Structural Basis of Antigen-Antibody Recognition. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, vol. 16, no. 1, p. 139–159, Jun. 1987. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.16.060187.001035>.

MOHD, H. A.; AL-TAWFIQ, J. A.; MEMISH, Z. A. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. **Virology Journal**, vol. 13, no. 1, Jun. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0544-0>.

- MOTTIN, M. **Dinâmica Molecular do receptor ativador da proliferação de peroxissomos gama: associação com ligantes e proteínas corregulatórias**. 2015. Tese – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2015. Available at: repositorio.unicamp.br/Busca/Download?codigoArquivo=505773.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6th ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment 1 Edited by J. Thornton. *Journal of Molecular Biology*, vol. 302, no. 1, p. 205–217, Sep. 2000. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>.
- OLIVEIRA, G. S. **Análise da interação molecular proteína-herbicida através de simulação computacional: aplicação no desenvolvimento de nanobiossensores**. 2013. Tese – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2013. Available at: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6267?show=full>.
- ONG, S. W. X.; CHIEW, C. J.; ANG, L. W.; MAK, T.-M.; CUI, L.; TOH, M. P. H. S.; LIM, Y. D.; LEE, P. H.; LEE, T. H.; CHIA, P. Y.; MAURER-STROH, S.; LIN, R. T. P.; LEO, Y.-S.; LEE, V. J.; LYE, D. C.; YOUNG, B. E. Clinical and virological features of SARS-CoV-2 variants of concern: a retrospective cohort study comparing B.1.1.7 (Alpha), B.1.315 (Beta), and B.1.617.2 (Delta). *Clinical Infectious Diseases*, p. 1–9, Aug. 2021. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab721>.
- PAIZS, B.; SUHAI, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 24, no. 4, p. 508–548, Aug. 2005. <https://doi.org/10.1002/mas.20024>.
- PEIRIS, J. S. M. Coronaviruses. *Clinical Virology*. [S. l.]: ASM Press, 2016. p. 1243–1265. <https://doi.org/10.1128/9781555819439.ch52>.
- PEKAR, J. E.; MAGEE, A.; PARKER, E.; MOSHIRI, N.; IZHIKEVICH, K.; HAVENS, J. L.; GANGAVARAPU, K.; MALPICA SERRANO, L. M.; CRITS-CHRISTOPH, A.; MATTESSON, N. L.; ZELLER, M.; LEVY, J. I.; WANG, J. C.; HUGHES, S.; LEE, J.; PARK, H.; PARK, M.-S.; CHING ZI YAN, K.; TZER PIN LIN, R.; MAT ISA, M. N. SARS-CoV-2 emergence very likely resulted from at least two zoonotic events. Feb. 2022. **Zenodo (Preprint)**. Available at: <https://zenodo.org/record/6291628#.YiJv6xtv9kh>.

- PELLEQUER, J. L.; WESTHOF, E. PREDITOP: A program for antigenicity prediction. **Journal of Molecular Graphics**, vol. 11, no. 3, p. 204–210, Sep. 1993. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(93\)80074-2](https://doi.org/10.1016/0263-7855(93)80074-2).
- PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; MENG, E. C.; COUCH, G. S.; CROLL, T. I.; MORRIS, J. H.; FERRIN, T. E. UCSF ChimeraX : Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, vol. 30, no. 1, p. 70–82, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>.
- POH, C. M.; CARISSIMO, G.; WANG, B.; AMRUN, S. N.; LEE, C. Y.-P.; CHEE, R. S.-L.; FONG, S.-W.; YEO, N. K.-W.; LEE, W.-H.; TORRES-RUESTA, A.; LEO, Y.-S.; CHEN, M. I.-C.; TAN, S.-Y.; CHAI, L. Y. A.; KALIMUDDIN, S.; KHENG, S. S. G.; THIEN, S.-Y.; YOUNG, B. E.; LYE, D. C.; HANSON, B. J. Two linear epitopes on the SARS-CoV-2 spike protein that elicit neutralising antibodies in COVID-19 patients. **Nature Communications**, vol. 11, no. 1, Jun. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16638-2>.
- POTOCNAKOVA, L.; BHIDE, M.; PULZOVA, L. B. An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and In Silico Epitope Prediction. **Journal of Immunology Research**, vol. 2016, p. 1–11, Dec. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6760830>.
- RABI, F. A.; AL ZOUBI, M. S.; KASASBEH, G. A.; SALAMEH, D. M.; AL-NASSER, A. D. SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. **Pathogens**, vol. 9, no. 3, Mar. 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030231>.
- RAINES, R. T.; WENNEMERS, H. Peptides on the Rise. **Accounts of Chemical Research**, vol. 50, no. 10, p. 2419–2419, Oct. 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00471>.
- RANDO, H. M.; MACLEAN, A. L.; LEE, A. J.; LORDAN, R.; RAY, S.; BANSAL, V.; SKELLY, A. N.; SELL, E.; DZIAK, J. J.; SHINHOLSTER, L.; D'AGOSTINO MCGOWAN, L.; BEN GUEBILA, M.; WELLHAUSEN, N.; KNYAZEVA, S.; BOCA, S. M.; CAPONE, S.; QI, Y.; PARK, Y.; MAI, D.; SUN, Y. Pathogenesis, Symptomatology, and Transmission of SARS-CoV-2 through Analysis of Viral Genomics and Structure. **mSystems**, vol. 6, no. 5, Oct. 2021. <https://doi.org/10.1128/msystems.00095-21>.
- ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDScript server. **Nucleic Acids Research**, vol. 42, no. W1, p. W320–W324, Apr. 2014. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>.

ROCKSTROH, A.; MOGES, B.; BARZON, L.; SINIGAGLIA, A.; PALÙ, G.; KUMBUK-GOLLA, W.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; SARNO, M.; BRITES, C.; MOREIRA-SOTO, A.; DREXLER, J. F.; FERREIRA, O. C.; ULBERT, S. Specific detection of dengue and Zika virus antibodies using envelope proteins with mutations in the conserved fusion loop. **Emerging Microbes & Infections**, vol. 6, no. 1, p. 1–9, Jan. 2017. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.87>.

ROE, D. R.; CHEATHAM, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. **Journal of Chemical Theory and Computation**, vol. 9, no. 7, p. 3084–3095, Jun. 2013. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, vol. 65, no. 1, p. 40–48, Aug. 2006. <https://doi.org/10.1002/prot.21078>.

SALAM, F.; TOTHILL, I. E. Detection of Salmonella typhimurium using an electrochemical immunosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 24, no. 8, p. 2630–2636, Apr. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.01.025>.

SALOMON-FERRER, R.; CASE, D. A.; WALKER, R. C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, vol. 3, no. 2, p. 198–210, 25 Sep. 2012. <https://doi.org/10.1002/wcms.1121>.

SANCHEZ-TRINCADO, J. L.; GOMEZ-PEROSANZ, M.; RECHE, P. A. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. **Journal of Immunology Research**, vol. 2017, p. 1–14, Dec. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2680160>.

SANDA, M.; MORRISON, L.; GOLDMAN, R. N- and O-Glycosylation of the SARS-CoV-2 Spike Protein. **Analytical Chemistry**, vol. 93, no. 4, p. 2003–2009, Feb. 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03173>.

SELA, M. Antigenicity: Some Molecular Aspects. **Science**, vol. 166, no. 3911, p. 1365–1374, Dec. 1969. <https://doi.org/10.1126/science.166.3911.1365>.

SHAJAHAN, A.; SUPEKAR, N. T.; GLEINICH, A. S.; AZADI, P. Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. **Glycobiology**, vol. 30, no. 12, p. 981–988, May 2020. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa042>.

SHRAKE, A.; RUPLEY, J. A. Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin. **Journal of Molecular Biology**, vol. 79, no. 2, p. 351–371, Sep. 1973. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90011-9).

- SIMMONS, G.; ZMORA, P.; GIERER, S.; HEURICH, A.; PÖHLMANN, S. Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: Cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. **Antiviral Research**, vol. 100, no. 3, p. 605–614, Dec. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.028>.
- SU, S.; WONG, G.; SHI, W.; LIU, J.; LAI, A. C. K.; ZHOU, J.; LIU, W.; BI, Y.; GAO, G. F. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. **Trends in Microbiology**, vol. 24, no. 6, p. 490–502, Jun. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>.
- SUN, P.; QIE, S.; LIU, Z.; REN, J.; LI, K.; XI, J. Clinical characteristics of 50 466 hospitalized patients with 2019-nCoV infection. **Journal of Medical Virology**, vol. 92, p. 612–617, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.25735>.
- SÜSSMUTH, R. D.; MAINZ, A. Nonribosomal Peptide Synthesis-Principles and Prospects. **Angewandte Chemie International Edition**, vol. 56, no. 14, p. 3770–3821, Mar. 2017. <https://doi.org/10.1002/anie.201609079>.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V. What Is a B-Cell Epitope? *In*: SCHUTKOWSKI, M.; REINEKE, U. (eds.). **Epitope Mapping Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2009. p. 3–20.
- VERLET, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physical Review**, vol. 159, no. 1, p. 98–103, 5 Jul. 1967. <https://doi.org/10.1103/physrev.159.98>.
- VIGERUST, D. J.; SHEPHERD, V. L. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. **Trends in Microbiology**, vol. 15, no. 5, p. 211–218, May 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.03.003>.
- VLIEGHE, P.; LISOWSKI, V.; MARTINEZ, J.; KHRESTCHATISKY, M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug Discovery Today**, vol. 15, no. 1-2, p. 40–56, Jan. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.10.009>.
- WAJNBERG, A.; AMANAT, F.; FIRPO, A.; ALTMAN, D. R.; BAILEY, M. J.; MANSOUR, M.; MCMAHON, M.; MEADE, P.; MENDU, D. R.; MUELLERS, K.; STADLBAUER, D.; STONE, K.; STROHMEIER, S.; SIMON, V.; ABERG, J.; REICH, D. L.; KRAMMER, F.; CORDON-CARDO, C. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. **Science**, vol. 370, no. 6521, p. 1227–1230, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abd7728>.

WANG, D.; HU, B.; HU, C.; ZHU, F.; LIU, X.; ZHANG, J.; WANG, B.; XIANG, H.; CHENG, Z.; XIONG, Y.; ZHAO, Y.; LI, Y.; WANG, X.; PENG, Z. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, vol. 323, no. 11, p. 1061–1069, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>.

WATANABE, Y.; ALLEN, J. D.; WRAPP, D.; MCLELLAN, J. S.; CRISPIN, M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. **Science**, vol. 369, no. 6501, p. 330–333, May 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>.

WEISS, S. R.; LEIBOWITZ, J. L. Coronavirus Pathogenesis. *In*: MARAMOROSCH, K.; SHATKIN, A. J.; MURPHY, F. A. (eds.). **Advances in Virus Research**. [S. l.]: Academic Press, 2011. p. 85–164. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385885-6.00009-2>.

WHO. **Situation Report 11**. Geneva: World Health Organization, Jan. 2020a. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200131-sitrep-11-ncov.pdf?sfvrsn=de7c0f7_4. Accessed on: 15 May 2020.

WHO. **Situation Report 51**. Geneva: World Health Organization, Mar. 2020b. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10. Accessed on: 20 Apr. 2020.

WHO. **Situation Report 158**. Geneva: World Health Organization, Jun. 2020c. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200626-covid-19-sitrep-158.pdf?sfvrsn=1d1aae8a_2. Accessed on: 26 Jun. 2020.

WINTJENS, R.; BIFANI, A. M.; BIFANI, P. Impact of glycan cloud on the B-cell epitope prediction of SARS-CoV-2 Spike protein. **npj Vaccines**, vol. 5, no. 1, Sep. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00237-9>.

WOO, H.; PARK, S.-J.; CHOI, Y. K.; PARK, T.; TANVEER, M.; CAO, Y.; KERN, N. R.; LEE, J.; YEOM, M. S.; CROLL, T. I.; SEOK, C.; IM, W. Developing a Fully Glycosylated Full-Length SARS-CoV-2 Spike Protein Model in a Viral Membrane. **The Journal of Physical Chemistry B**, vol. 124, no. 33, p. 7128–7137, Jun. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c04553>.

WOROBAY, M.; LEVY, J. I.; SERRANO, L. M. M.; CRITS-CHRISTOPH, A.; PEKAR, J. E.; GOLDSTEIN, S. A.; RASMUSSEN, A. L.; KRAEMER, M. U. G.; NEWMAN, C.; KOOPMANS, M. P. G.; SUCHARD, M. A.; WERTHEIM, J. O.; LEMEY, P.; ROBERTSON, D.

L.; GARRY, R. F.; HOLMES, E. C.; RAMBAUT, A.; ANDERSEN, K. G. The Huanan market was the epicenter of SARS-CoV-2 emergence. Feb. 2022. **Zenodo (Preprint)**. Available at: <https://zenodo.org/record/6299116#.YiJyCBtv9kg>.

WRAPP, D.; WANG, N.; CORBETT, K. S.; GOLDSMITH, J. A.; HSIEH, C.-L.; ABIONA, O.; GRAHAM, B. S.; MCLELLAN, J. S. Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation. **Science**, vol. 367, no. 6483, p. 1260–1263, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>.

XIAO, K.; ZHAI, J.; FENG, Y.; ZHOU, N.; ZHANG, X.; ZOU, J.-J.; LI, N.; GUO, Y.; LI, X.; SHEN, X.; ZHANG, Z.; SHU, F.; HUANG, W.; LI, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, R.-A.; WU, Y.-J.; PENG, S.-M.; HUANG, M.; XIE, W.-J. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. **Nature**, vol. 583, no. 7815, p. 286–289, May 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2313-x>.

XU, H.; ZHONG, L.; DENG, J.; PENG, J.; DAN, H.; ZENG, X.; LI, T.; CHEN, Q. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. **International Journal of Oral Science**, vol. 12, no. 8, 1 Feb. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>.

XU, W.; WANG, M.; YU, D.; ZHANG, X. Variations in SARS-CoV-2 Spike Protein Cell Epitopes and Glycosylation Profiles During Global Transmission Course of COVID-19. **Frontiers in Immunology**, vol. 11, Sep. 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.565278>.

YAN, R.; ZHANG, Y.; LI, Y.; XIA, L.; GUO, Y.; ZHOU, Q. Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. **Science**, vol. 367, no. 6485, p. 1444–1448, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>.

YAZAWA, K.; NUMATA, K. Recent Advances in Chemoenzymatic Peptide Syntheses. **Molecules**, vol. 19, no. 9, p. 13755–13774, Sep. 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules190913755>.

YOO, E.-H.; LEE, S.-Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. **Sensors**, vol. 10, no. 5, p. 4558–4576, May 2010. <https://doi.org/10.3390/s100504558>.

YU, L.; ZHANG, Y.; HU, C.; WU, H.; YANG, Y.; HUANG, C.; JIA, N. Highly sensitive electrochemical impedance spectroscopy immunosensor for the detection of AFB1 in olive oil. **Food Chemistry**, vol. 176, p. 22–26, Jun. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.030>.

YUAN, M.; LIU, H.; WU, N. C.; LEE, C.-C. D.; ZHU, X.; ZHAO, F.; HUANG, D.; YU, W.; HUA, Y.; TIEN, H.; ROGERS, T. F.; LANDAIS, E.; SOK, D.; JARDINE, J. G.; BURTON, D. R.; WILSON, I. A. Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2. **Science**, vol. 369, no. 6507, p. 1119–1123, Aug. 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abd2321>.

ZHANG, T.; WU, Q.; ZHANG, Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. **Current Biology**, vol. 30, no. 7, p. 1346–1351, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.022>.

ZHANG, Y.; ZHAO, W.; MAO, Y.; CHEN, Y.; WANG, S.; ZHONG, Y.; SU, T.; GONG, M.; DU, D.; LU, X.; CHENG, J.; YANG, H. Site-specific N-glycosylation Characterization of Recombinant SARS-CoV-2 Spike Proteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, vol. 20, p. 100058, Feb. 2021. <https://doi.org/10.1074/mcp.ra120.002295>.

ZHOU, F.; YU, T.; DU, R.; FAN, G.; LIU, Y.; LIU, Z.; XIANG, J.; WANG, Y.; SONG, B.; GU, X.; GUAN, L.; WEI, Y.; LI, H.; WU, X.; XU, J.; TU, S.; ZHANG, Y.; CHEN, H.; CAO, B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, vol. 395, no. 10229, p. 1054–1062, Mar. 2020. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30566-3).

ZHOU, P.; YANG, X.-L.; WANG, X.-G.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H.-R.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, C.-L.; CHEN, H.-D.; CHEN, J.; LUO, Y.; GUO, H.; JIANG, R.-D.; LIU, M.-Q.; CHEN, Y.; SHEN, X.-R.; WANG, X.; ZHENG, X.-S. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, vol. 579, no. 7798, p. 270–273, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X.; YANG, B.; SONG, J.; ZHAO, X.; HUANG, B.; SHI, W.; LU, R.; NIU, P.; ZHAN, F.; MA, X.; WANG, D.; XU, W.; WU, G.; GAO, G. F.; TAN, W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, vol. 382, no. 8, p. 727–733, Jan. 2020. <https://doi.org/10.1056/nejm-moa2001017>.