

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA APLICADAS

**REDESIGN COMPUTACIONAL DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS  
PARA O DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR (RBD) DA  
PROTEÍNA SPIKE DE SARS-CoV-2 COM AFINIDADE DE LIGAÇÃO  
AUMENTADA ÀS SUBLINHAGENS ÔMICRON**

Cecília Luiza Pereira

UBERLÂNDIA - MG  
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA APLICADAS

**REDESIGN COMPUTACIONAL DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS  
PARA O DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR (RBD) DA  
PROTEÍNA SPIKE DE SARS-CoV-2 COM AFINIDADE DE LIGAÇÃO  
AUMENTADA ÀS SUBLINHAGENS ÔMICRON**

Dissertação apresentada ao colegiado do  
Programa de Pós-graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Discente: Cecília Luiza Pereira

Orientador: Jair Pereira da Cunha Junior

UBERLÂNDIA - MG

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

P436 2023	<p>Pereira, Cecília Luiza, 1998- REDESIGN COMPUTACIONAL DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA O DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR (RBD) DA PROTEÍNA SPIKE DE SARS-CoV-2 COM AFINIDADE DE LIGAÇÃO AUMENTADA ÀS SUBLINHAGENS ÔMICRON [recurso eletrônico] / Cecília Luiza Pereira. - 2023.</p> <p>Orientadora: Jair Pereira da Cunha Junior. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.86">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.86</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Cunha Junior, Jair Pereira da ,1974- , (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicada

Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado nº 286				
Data:	24/02/2023	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:30
Matrícula do Discente:	12112IPA002				
Nome do Discente:	Cecília Luiza Pereira				
Título do Trabalho:	Redesign computacional de anticorpos específicos para o domínio de ligação do receptor (RBD) da proteína spike de SARS-CoV-2 com afinidade de ligação aumentada às sublinhagens ômicron				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunologia e Biologia Celular de Patógenos Causadores de Doenças Infecciosas e Parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Produção e seleção de anticorpos scFv monoclonais reativos ao domínio de ligação do receptor celular (RBD) da proteína da spike de variantes de SARS-CoV-2.				

Reuniu-se no dia 24 de fevereiro, às 14h00, por vídeo conferência, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Jair Pereira da Cunha Junior ICBIM/UFU (Presidente) orientadora da candidata; Cláudio Vieira da Silva - ICBIM/UFU; Flávio Henrique da Silva - UFSCAR.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, o Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior, apresentou a Comissão Examinadora, e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

**APROVADA(O).**

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Jair Pereira da Cunha Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2023, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Vieira da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2023, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Henrique da Silva, Usuário Externo**, em 24/02/2023, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4265402** e o código CRC **17FECF60**.

---

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por ter me dado forças e esperanças para seguir meus sonhos e enfrentar cada batalha que surgiu ao longo dessa jornada.

Aos meus pais e irmãs que sempre acreditaram no meu potencial. Obrigada por todo apoio e amor que me dão! Quem eu sou hoje se deve a vocês!

Ao meu marido, Ian, que sempre me incentivou a continuar apesar dos obstáculos, por acreditar mais em mim do que eu mesma, por seu meu abrigo, meu melhor amigo e meu amor. Sou grata por ter você e a Nina em minha vida, vocês me fazem feliz todos os dias!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, obrigada por me receber em seu laboratório e me aceitar como sua aluna. Foi um verdadeiro prazer e orgulho ser sua aluna. Sou muito grata pela confiança, orientações, paciência e ensinamentos.

Aos demais professores que me acompanharam até aqui nesta jornada, obrigada por me acolherem e agregar em meus conhecimentos.

Ao Nilson Nicolau Junior, agradeço a valiosa ajuda e disposição de compartilhar seus conhecimentos, sem você esse trabalho seria impossível.

Ao Carlos Roberto Prudêncio, por gentilmente me receber em seu laboratório, pelos ensinamentos, por esta e futuras contribuições.

Agradeço também ao Victor Hugo Oliveira de Andrade, Daniel Ferreira de Lima Neto, pelas valiosas contribuições para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas (PPIPA) - UFU e ao órgão de fomento CAPES.

E por fim, agradeço a vida, por ser tão bela e misteriosa que me anseia estudá-la.

## RESUMO

A doença COVID-19, apesar dos esforços vacinais, ainda é responsável por elevado número de casos e mortes em todo o mundo. O surgimento de novas variantes contendo inúmeras mutações associadas à maior transmissibilidade, infectividade e evasão de anticorpos neutralizantes, representa a grande dificuldade atual em limitar a propagação da doença. O objetivo deste estudo foi utilizar design computacional de proteínas para redesenhar as CDRs do anticorpo CV30, a fim de aumentar a afinidade de ligação do anticorpo ao RBD das sublinhagens Omicron de SARS-CoV-2. Os resultados demonstram que os anticorpos redenhados, CV30 BA.4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1, apresentaram maior afinidade de ligação computacionalmente calculada com os respectivos RBDs das sublinhagens Omicron, com ligação  $\Delta G$  (Rosetta) de  $-56,8$  REU e  $-52,5$  REU, respectivamente. Os anticorpos redenhados demonstraram maiores modificações nas CDRH3 e CDRs leves, em comparação com o anticorpo parental CV30. Além disso, ambos os anticorpos apresentaram área de interface aumentada com os RBDs das respectivas sublinhagens Omicron. Os anticorpos redenhados são candidatos promissores como anticorpos neutralizantes específicos para o RBD das sublinhagens BA.4/5 e BA.5 BQ.1.1.

**Palavras-chave:** anticorpos neutralizantes; redesign computacional; sublinhagens Omicron.

## ABSTRACT

The COVID-19 disease, despite vaccine efforts, is still responsible for a high number of cases and deaths worldwide. The emergence of new variants containing numerous mutations associated with greater transmissibility, infectivity and evasion of neutralizing antibodies represents the current great difficulty in limiting the spread of the disease. The aim of this study was to use computational protein design to redesign the CDRs of the CV30 antibody in order to increase the binding affinity of the antibody to the RBD of the Omicron sublineages of SARS-CoV-2. The results demonstrate that the redrawn antibodies, CV30 BA.4/5 and CV30 BA.5 BQ.1.1, showed a computationally higher binding affinity with the respective RBDs of the Omicron sublineages, with  $\Delta G$  (Rosetta) binding of  $-56.8$  REU and  $-52.5$  REU, respectively. The redesigned antibodies demonstrated greater changes in CDRH3 and light CDRs, compared to the antibody CV30. Furthermore, both antibodies showed increased interface area with the RBDs of the respective Omicron sublineages. The redesigned antibodies are promising candidates as neutralizing antibodies specific for the RBD of the BA.4/5 and BA.5 BQ.1.1 sublineages.

**Keywords:** neutralizing antibodies; computational redesign; Omicron sublineages.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura geral do vírus SARS-CoV-2. _____	27
<b>Figura 2:</b> Processo de replicação viral do SARS-CoV-2. _____	29
<b>Figura 3:</b> Análise do RBD de sublinhagens Omicron de SARS-CoV-2. _____	44
<b>Figura 4:</b> Comparação dos anticorpos específicos para RBD. _____	47
<b>Figura 5:</b> Redesenho computacional do mAb CV30 específico para RBD. _____	50

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1:</b> Características e Referências dos anticorpos selecionados.....	45
<b>Tabela 2:</b> Nomenclatura dos aminoácidos e seus respectivos códigos (1 letra).....	55

## LISTA DE ABREVIACÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>Å</b>	Ångström
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígeno
<b>BCV</b>	Coronavírus bovino
<b>CDR</b>	Região determinante de complementariedade
<b>CDR L</b>	Região determinante de complementariedade de cadeia leve
<b>CDR H</b>	Região determinante de complementariedade de cadeia pesada
<b>CoV</b>	Coronavírus
<b>COVID-19</b>	Doença do coronavírus 2019
<b>DAMP</b>	Padrões moleculares associados à danos
<b>Del</b>	Deleção (mutação)
<b>ECA-2</b>	Receptor de angiotensina 2
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>Fab</b>	Fragmento de ligação do antígeno
<b>Fc</b>	Fragmento cristalizável
<b>FIG</b>	Figura
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos
<b>HE</b>	Hemaglutinina-esterase
<b>hCoV</b>	Coronavírus humano
<b>hNAb</b>	Anticorpo neutralizante humano
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-10</b>	Interleucina 1
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IMGT</b>	ImMunoGeneTics
<b>Kb</b>	Quilobases
<b>KD</b>	Constante de afinidade

<b>mAb</b>	Anticorpo monoclonal
<b>MERS</b>	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
<b>MHV</b>	Vírus da hepatite murina
<b>nAb</b>	Anticorpo neutralizante
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NBM</b>	Motivo de ligação ao receptor
<b>NTD</b>	Domínio N-terminal
<b>NLRP3</b>	Proteína 3 contendo domínio de pirina da família NLR
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ORF3a</b>	Quadro de leitura aberta 3a (do inglês, Open reading frame)
<b>PAMP</b>	Padrões moleculares relacionados à patógenos
<b>PDB</b>	Protein Data Bank/ file
<b>RBD</b>	Domínio de ligação ao receptor
<b>RBM</b>	Motivo de ligação ao receptor
<b>RMSD</b>	Raiz do desvio quadrático médio
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>RAbD</b>	Rosetta Antibody Design
<b>REU</b>	Unidade de energia livre Rosetta
<b>S1</b>	Subunidade 1 da proteína Spike
<b>S2</b>	Subunidade 2 da proteína Spike
<b>SARS</b>	síndrome respiratória aguda grave
<b>SARS-CoV-2</b>	síndrome respiratória aguda grave 2
<b>SDRA</b>	síndrome do desconforto respiratório agudo
<b>SRAG</b>	Síndrome Respiratória Aguda Grave
<b>SRAA</b>	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
<b>TLR</b>	Receptor tipo Tool-Like
<b>TMPRSS2</b>	Serino-protease transmembrana II
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alpha
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>VOC</b>	Variante de preocupação
<b>VOI</b>	Variante de interesse

<b><math>\Delta G_{\text{bind}}</math> [Rosetta]</b>	Energia de ligação (Rosetta)
<b><math>\Delta G_{\text{bind}}</math>(MM-GBSA)</b>	Energia de ligação (molecular mechanics/generalized Born surface area)
<b><math>\mu\text{g/ml}</math></b>	Micrograma por mililitro
<b><math>\pm</math></b>	Mais ou menor
<b><math>\text{kcal/mol}</math></b>	Quilocaloria por mol
<b><math>-</math></b>	Negativo
<b><math>&lt;</math></b>	Menor
<b><math>\geq</math></b>	Maior ou igual
<b><math>\%</math></b>	Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	26
1.1 COVID-19.....	26
1.2 SARS-CoV-2: Etiologia e estrutura viral.....	27
1.3 Mecanismo de replicação viral.....	29
1.4 Patogênese do SARS-CoV-2.....	31
1.5 Variantes e sublinhagens de SARS-CoV-2.....	32
1.6 Anticorpos específicos à SARS-CoV-2.....	34
1.7 Vacinas contra COVID-19.....	36
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	38
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos .....	39
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
4.1 Análise de sequências RBD, modelagem molecular e previsão estrutural.....	40
4.2 Seleção de modelos de anticorpos .....	40
4.3 Cálculo do desvio quadrático médio (RSMD) por resíduo dos anticorpos.....	41
4.4 Redesenho computacional de proteínas .....	41
<b>5. RESULTADOS</b> .....	43
5.1 Análise de RBD das sublinhagens de SARS-CoV-2 Omicron .....	43
5.2 Seleção e análise de anticorpos .....	45
5.3 Redesenho computacional de anticorpos específicos à RBD de sublinhagens Omicron.....	48
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>8. ANEXO</b> .....	55
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	56

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 COVID-19

Em dezembro de 2019, surgiu relatos de casos de uma pneumonia acometendo a cidade de Wuhan, China. No início de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS), denominou a doença como Corona Virus Disease 2019 (COVID-19) e a declarou como pandemia global em março de 2020 (CHEN et al., 2020; ALEEM et al., 2022). Desde então, essa doença infecciosa altamente contagiosa alcançou mais de 755.041.562 milhões de casos confirmados, e 6.830.867 milhões de mortes (WHO 2023a).

O patógeno causador da doença foi isolado a partir de amostras de lavado bronco-alveolar de indivíduos infectados, e foi então denominado coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) (TAN, ZHAO e MA, 2020). O vírus pertence ao mesmo subgênero da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), o qual causou uma epidemia em 2003 na China, e da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS), que acometeu a Ásia Ocidental em 2012 (STRABELLI e UIP, 2020).

COVID-19 é uma doença viral que afeta, na maioria dos casos, o sistema respiratório. A sua transmissão ocorre principalmente por meio de partículas respiratórias, porém, também foi relatado possível transmissão por aerossóis e por meio de superfícies contaminadas com o vírus (HARRISON, LIN e WANG, 2020). Casos de transmissão vertical, ou seja, da mãe para o feto ou recém-nascido, também é possível, entretanto ocorre em uma minoria de casos (KOTLYAR et al., 2021). Estudo de caso relataram presença do vírus vivo em fezes de pacientes infectados por coronavírus, indicando possível transmissão fecal-oral (YEO, KAUSHAL e YEO, 2020).

O período de incubação do vírus SARS-CoV-2-Wuhan foi estimado em 5,1 dias (IC 95%, 4,5-5,8 dias), e a maioria dos indivíduos infectados desenvolverá os sintomas dentro de 11,5 dias (IC, 8,2-15,6 dias) após a infecção (LAUER et al., 2020). Entre 17,9% e 33,3% dos indivíduos infectados por SARS-CoV-2 de Wuhan são casos assintomáticos (MIZUMOTO et al., 2020). As principais manifestações clínicas apresentadas por pacientes sintomáticos são: febre, tosse seca, mialgia, fadiga e coriza. Sintomas menos comuns incluem alterações gustativas e olfativas, diarreia e vômito (WIERSINFA et al., 2020; HUANG et al., 2020).

A presença de comorbidades também é um fator relevante, uma vez que estão associadas a casos graves da doença e a mortalidade. Dentre elas destacam-se diabetes mellitus, hipertensão, doenças cardiovasculares, doença renal crônica, câncer, doença pulmonar crônica,

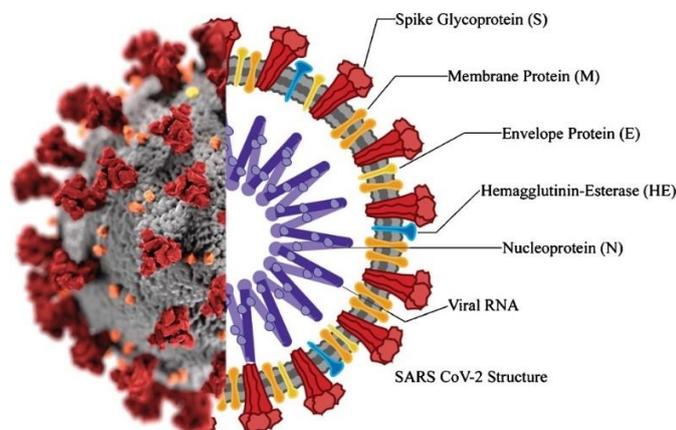
obesidade grave (índice de massa corporal  $\geq 40$ ) e doença hepática (WHAN et al., 2020; HUANG et al., 2020).

Dentre os fatores que justificam a associação dessas comorbidades com o agravamento do quadro clínico de COVID-19, encontram-se: tendência a processo inflamatório e maior expressão nas células do receptor responsável pela entrada viral, o receptor de enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) (FRAGA- SILVA et al., 2021).

## 1.2 SARS-CoV-2: Etiologia e estrutura viral

Os coronavírus (CoVs), são vírus envelopados, compostos basicamente por proteínas e ácido ribonucléico (RNA) de cadeia simples e de sentido positivo (ELFIKY et al., 2020). A denominação “coronavírus” se refere ao termo em latim *corona*, que significa “coroa”, devido ao aspecto de múltiplas projeções da membrana do vírus, ao ser visualizado por meio de microscopia eletrônica (MASTERS, 2006). A família *Coronaviridae* é subdividida nos gêneros alfa, beta, gama e delta-coronavírus (LIU, J. et al., 2020), sendo o SARS-CoV-2 pertencente ao gênero beta-coronavírus, e sétimo coronavírus humano (HCoV) a ser identificado na família (WU, F. et al., 2020).

O SARS-CoV-2 apresenta 16 proteínas não estruturais, 5-8 proteínas acessórias e 4 proteínas estruturais (JIANG, HILLYER e DU, 2020). As principais proteínas são: proteína S (Spike), E (Envelope), M (Membrana), N (Nucleocapsídeo) (CÂNDIDO, 2021). **(Figura 1)**



**Figura 1: Estrutura geral do vírus SARS-CoV-2.** Destaca-se os seus constituintes: glicoproteínas Spike (S), proteínas da membrana (M), proteínas do envelope (E), hemaglutinina-esterase (HE), ácido ribonucléico (RNA) e proteína do nucleocapsídeo (N). Fonte: YAMAMOTO, et al., 2020.

A proteína M, a mais abundante, define a forma do envelope viral e participa na replicação por meio de interações com as outras proteínas (NAL et al., 2005). A interação entre a proteína M e a proteína N auxilia no processo de montagem viral, estabilizando o complexo proteína N/RNA (FEHR, 2015). A proteína M ao se associar ao RNA viral sinaliza o seu empacotamento durante o processo de replicação viral (NARAYANA, 2003).

A proteína E é a menor das proteínas estruturais e possui papel fundamental na patogenicidade e na produção e maturação viral (SIU et al., 2008). Esta proteína apresenta papel multifuncional, participando de processos como: formação do nucleocapsídeo e do envelope viral, auxilia na montagem e brotamento de novas partículas virais, tráfego intracelular e ativação do inflamassoma (SILVA e DE SÁ, 2021).

Proteínas presentes no SARS-CoV-2 e outros vírus, como proteínas condutoras de íons ou viroporinas, por exemplo a ORF3a e a proteína E, podem ativar o inflamassoma NLRP3 via indução de canais iônicos (VORA, LIEBERMAN e WU, 2021; DUTTA et al., 2022). Os inflamassomas são montados em resposta a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs), e desencadeiam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, assim como, o processo de piroptose (BROZ e DIXIT, 2016; SWANSON et al., 2019). Desse modo, a ativação do inflamassoma NLRP3, expresso em células epiteliais alveolares e endoteliais pulmonares, pode contribuir na patogênese de algumas infecções pulmonares (WU J. et al., 2013; SWANSON, DENG e TING, 2019; ITO et al., 2020).

A proteína N, além de encapsular o RNA viral, o protegendo e formando o nucleocapsídeo, auxilia na replicação viral na célula hospedeira (CUI, 2015). O RNA dos coronavírus possuem tamanho de 27,6 a 31 Kb, sendo o maior genoma entre os vírus de RNA (DECARO e LORUSSO, 2020).

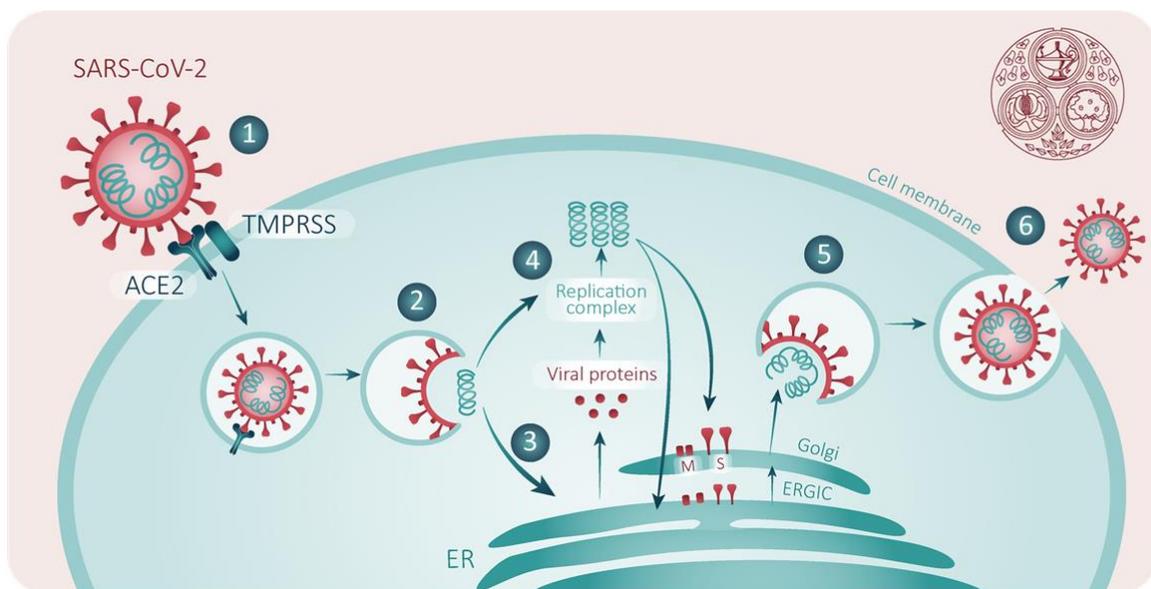
As Spike (S) são glicoproteínas triméricas que formam espículas projetadas do envelope viral para o meio externo. Sendo as responsáveis por mediar a ligação do vírus à membrana da célula hospedeira. (YUAN et al. 2020a). A proteína S consiste em três segmentos: um ectodomínio, uma âncora transmembrana de passagem única e uma cauda intracelular curta (LI, 2016). O ectodomínio se divide em subunidade S1, que possui um domínio de ligação ao receptor da célula hospedeira, o RBD, e subunidade S2, de formado espiralado (alfa-hélice) que auxilia durante a fusão do vírus com a membrana celular (HAMED, 2020).

Ademais, os betacoronavírus apresentam uma proteína estrutural adicional, o dímero hemaglutinina-esterase (HE), proteína intermediadora no processo de ligação viral (DECARO e LORUSSO, 2020). A HE reconhece o ácido siálico presente na membrana das células

pulmonares. Esta proteína também foi identificada em outros vírus, como: influenzavírus C, vírus da hepatite (MHV) e coronavírus bovino (BCV) (PEREIRA, DA CRUZ, LIMA, 2021).

### 1.3 Mecanismo de replicação viral

Em síntese, o processo de invasão do coronavírus envolve primeiramente o reconhecimento das glicoproteínas Spike (S) por receptores específicos da célula hospedeira, posteriormente fusão das membranas viral e celular, e liberação do material genético do vírus no interior da célula para posterior replicação e transcrição das proteínas virais (YUAN et al., 2020a). O processo de replicação viral do coronavírus SARS-CoV-2 pode ser visualizado na **Figura 2**.



**Figura 2: Processo de replicação viral do SARS-CoV-2.** [1] A proteína Spike liga-se à ECA-2 com o auxílio da enzima TMPRSS2; [2] Liberação do RNA viral dentro da célula do hospedeiro; [3] Tradução do RNA viral pela maquinaria da célula; [4] Algumas proteínas virais formam um complexo de replicação para produzir mais RNA viral [5] Montagem e [6] liberação dos novos vírus. **Fonte:** Ward, P et al. (2023).

A primeira etapa para entrada do SARS-CoV-2 nas células-alvo envolve o reconhecimento e interação do RBD da subunidade S1 com os receptores humanos da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) (SONG et al., 2018; QI et al., 2020). Os receptores ECA-2 são expressos em diversos tecidos, como brônquios, pulmão, traqueia, nasofaringe, intestino, rins, coração, vasos sanguíneos, cérebro, entre outros. (KHATRI, STAAL e VAN DONGEN,

2021). A interação entre RBD e ECA-2 ocasiona mudanças conformacionais nas proteínas S, expondo o sítio de clivagem da subunidade S2, responsável pela fusão das membranas viral e celular (RABI et al., 2020; HOFFMANN et al., 2020).

A clivagem de S2 e penetração do vírus na célula pode ocorrer através de dois mecanismos, via endossomo e via serino-protease transmembrana II (TMPRSS2). Quando a célula expressar insuficientemente, ou não expressar, TMPRSS2, o complexo vírus-ECA-2 é internalizado via endocitose mediada por clatrin, e posteriormente clivagem de S2 dentro dos endossomos tardios (WANG et al., 2008; YUAN et al., 2017; OU et al., 2020).

A endocitose mediada por clatrina inicia-se com o recrutamento de complexos adaptinas (AP-2) que interage com domínios citoplasmáticos ricos em resíduos de tirosina e coordena a montagem de uma rede de clatrin, que por sua vez conduz a invaginação da membrana citoplasmática e formação de uma vesícula revestida por clatrin (DE ALMEIDA et al., 2020)

Dentro do endolisossomo, a subunidade S2 pode ser clivada por proteases do endossomo tardio e acarretar a fusão das membranas viral e endossomal, liberando o RNA viral no citoplasma, ou ocorre a degradação total das proteínas estruturais do SARS-CoV-2 através da acidificação endossomal e ação de catepsinas lisossomais, possibilitando também a liberação no citoplasma do material genético viral (YANG e SHEN, 2020).

O outro mecanismo envolve a intermediação da TMPRSS2, que realiza a clivagem de S2 na superfície celular, possibilitando a fusão das membranas viral e celular e formação de um poro pelo qual o RNA viral é liberado no citoplasma (JIANG, HILLYER e DU, 2020). Este mecanismo, promove uma replicação viral 100 vezes maior do que o mecanismo via endossomo (MATSUYAMA et al., 2005). A menor dependência da via endossomal como meio de entrada para o SARS-CoV-2 pode explicar o efeito limitado de inibidores da acidificação endossomal, como a hidroxicloroquina, em restringir a infecção de células-alvo (JACKSON et al., 2022).

Após entrada na célula e liberação do genoma viral no citoplasma, o processo de tradução nos ribossomos logo se inicia, uma vez que o RNA é simples e de sentido direto, funcionando diretamente como um RNA mensageiro (mRNA). Primeiramente são codificadas duas poliproteínas virais, pp1a e pp1ab, que são clivadas por proteases em 16 proteínas não estruturais (nsp1-nsp16) (DE ALMEIDA et al., 2020). As proteínas não estruturais (nsp) formam o complexo de replicação-transcrição (RTC) que se organiza em vesículas de membrana dupla (DMVs) derivadas do retículo endoplasmático (GAO et al., 2020; LI et al., 2020).

A posterior replicação do RNA viral é fundamental para o ciclo replicativo, formando assim molde para a transcrição de proteínas acessórias e estruturais, além de novos RNAs virais

destinados a montagem de novos vírions (SHEREEN et al., 2020). Segue-se então as etapas de montagem e maturação dos vírions, e posteriormente transporte e liberação dos vírus maduros para o meio extracelular por meio de vesículas (CARVALHO, 2020).

#### **1.4 Patogênese do SARS-CoV-2**

A patogênese da infecção por SARS-CoV-2 pode ser explicada por duas fases, uma fase inicial e uma fase tardia. A fase inicial caracteriza-se por uma intensa replicação viral o que resulta em dano tecidual direto mediado pelo vírus (AZHUR et al., 2020). A replicação viral do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras ocasiona apoptose ou piroptose das células infectadas e consequentemente danos vasculares e/ou alveolares, e extravasamento de conteúdos celulares, proteínas virais e leucócitos para a matriz pulmonar (DE ALMEIDA et al., 2020).

Na fase tardia, ocorre a intensa estimulação do sistema imune inato por padrões moleculares associadas a patógenos (PAMPs) e células apresentadoras de antígenos virais (APCs), que desencadeia uma resposta imunológica mediada por citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10, e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (TAY et al., 2020; AZHUR et al., 2020).

Espera-se que em casos nos quais a carga viral não é elevada e o indivíduo seja imunocompetente, o combate ao vírus seja rápido e o paciente apresentará apenas sintomas leves (RAMANATHAN et al., 2020). Em outros casos, a elevada replicação viral, níveis altos de citocinas inflamatórias e destruição de células endoteliais pulmonares como os pneumócitos tipo I - responsáveis por trocas gasosas- e pneumócitos tipo II – produtores de surfactante, podem superar os mecanismos de resolução do organismo, levando ao agravamento do quadro clínico (HUY et al., 2020; WIERSINGA et al., 2020).

A “tempestade de citocinas”, fenômeno no qual o organismo desenvolve uma resposta exacerbada com elevados níveis de citocinas inflamatórias, está associado ao agravamento da doença e falência de múltiplos órgãos (VERAS et al., 2020; ALBUQUERQUE et al., 2021). Este processo provoca intenso dano celular e tecidual, devido a inflamação pulmonar e sistêmica, que podem progredir para quadros de pneumonia viral, sepse, síndrome respiratória aguda grave (SRAG), além de possíveis complicações cardiovasculares, neurais, hepáticas e renais (PROMPETCHARA, KETLOV e PALAGA, 2020; ALLEM et al., 2022).

A SRAG é uma das principais causas de morte de pacientes infectados por SARS-CoV-2 e ocorre devido a intensa inflamação e dano tecidual pulmonar que resulta em fibrose e mau funcionamento do órgão (ZUMLA et al., 2020). A inflamação pulmonar observada em alguns casos também é resultado da ativação de receptores Toll-Like (TLR), como TLR2, TLR3 e TLR4, que induz a liberação de pró-inflamatórias (CONTI et al., 2020).

Outros mecanismos estão envolvidos na patogênese dos casos graves de COVID-19, como: toxicidade viral direta, endotelite ocasionado por lesão viral, trombose, lesões isquêmicas causada por vasculite, desregulação do sistema angiotensina-aldosterona (SRAA) devido a maior ativação dos receptores ECA-2, e aumento da permeabilidade vascular por meio da ativação da via calicreína-bradicinina (TEUWEN et al., 2020; ACKERMANN et al., 2020; VAN DE VEERDONK et al., 2020; COOPERSMITH et al., 2021).

### **1.5 Variantes e sublinhagens de SARS-CoV-2**

Durante o processo de replicação, os vírus passam por mecanismos de variação genética, como mutações e recombinação ou rearranjos gênicos, que podem proporcionar ao vírus evasão do sistema imunológico, maior eficiência na invasão da célula hospedeira, modificar fatores de virulência, entre outras características. Dessa forma, com o passar do tempo, os vírus naturalmente adquirem mutações, ocasionando o surgimento de variantes (DOMINGO, 2010).

Os RNA vírus tendem a sofrer mutações gênicas com maior frequência do que os vírus constituídos de DNA, isto se deve a erros durante a replicação via RNA polimerase ou transcriptase reversa (ROMANOS, SANTOS e WIGG, 2015). Apesar dos coronavírus apresentarem um mecanismo de revisão genética, a enzima exoribonuclease 3' a 5', é possível ocorrer mutações durante a replicação viral principalmente como forma de adaptação em resposta à seleção natural (SMITH et al., 2013; HARVEY et al., 2021).

Apesar da taxa de mutações do SARS-CoV-2 ser baixa, devido ao seu mecanismo enzimático de revisão genética, a rápida disseminação do vírus, seu alcance global, e o elevado número de indivíduos infectados, têm levado ao surgimento de novas variantes que são associadas ao aumento do número de novos casos e reinfecções (SHAHHOSSEINI et al., 2021).

A OMS, segundo fatores como fenótipo, transmissibilidade e virulência, classifica as variantes de SARS-CoV-2 em variantes de preocupação (VOC, do inglês, variant of concern) e variantes de interesse em saúde pública (VOI, do inglês variant of interest). Entre as VOC's encontram-se as variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (B.1.1.28.1), Delta (B.1.617.2)

e Omicron (B.1.1.529). E no grupo das VOIs, as variantes Eta (B.1.525), Epsilon (B.1.427/B.1.429), Zeta (B.1.1.28.2), Teta (B.1.1.28.3), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), Lambda (C.37) e Mu (B.1.621) (WHO, 2023b).

A variante Alfa (B.1.1.7), surgiu na Inglaterra em setembro de 2020 e logo se espalhou pelo Reino Unido, apresentando maior transmissibilidade do que as variantes anteriores (RAMBAUT, et al., 2020). A B1.1.7 contém oito mutações e duas deleções (delH69/V70 e delY144) na proteína Spike, além da substituição D614G, relatada em variantes anteriores (WANG et al., 2021). Estudos indicaram que a Alpha se espalhou 50% mais rápido do que as outras variantes até então identificadas (VOLZ et al., 2021). A variante também apresentou sensibilidade seis vezes menor aos soros de indivíduos vacinados com Pfizer/BioNTech (GRUPTA, 2021).

Em outubro de 2020, foi identificada a variante Beta (B.1.351), em Eastern Cape, África do Sul (TEGALLY, 2021), e em dezembro de 2020 foram identificadas as variantes: Gama (B.1.1.28.1 ou P.1) no Brasil, Kappa (B.1.617.1) e Delta (B.1.617.2), na Índia (MICHELON, 2021). Estas variantes apresentaram sensibilidade reduzida a anticorpos monoclonais (mAbs), evasão imunológica após vacinação ou infecção natural e maior transmissibilidade (TAO et al., 2021; MICHELON, 2021).

Em novembro de 2021, foi identificada em Botsuana, África do Sul, a variante B.1.1.529, que rapidamente espalhou-se pelo mundo e foi classificada pela OMS como uma VOC, sendo nomeada Omicron. Posteriormente, sublinhagens de Omicron foram identificadas: BA.1, BA.2 e BA.3, responsáveis pela maioria dos casos na quarta onda epidêmica; BA.4 e BA.5, duas sublinhagens derivadas de BA.2 (TEGALLY, et al. 2022), e, BQ.1 e BQ.1.1, derivadas de BA.5 (QU et al., 2022).

O período de incubação da variante Omicron é de três dias, logo o indivíduo desenvolve sintomas mais rápido, em comparação com variantes anteriores (INSTITUTO BUTANTAN, 2023). Além disso, foram relatadas mudanças no perfil clínico da infecção por Omicron, sendo os sintomas mais semelhantes à resfriados, e menor frequência no relato de perda ou alteração do paladar ou olfato (GRAHAN et al., 2021; BUTOWT, BILINSKA e VON BARTHELD, 2022). Apesar disso, casos de Omicron, foram associados à maior número de sintomas relatados e maior necessidade de interrupção das atividades cotidianas (WHITAKER et al., 2022).

A variante Omicron exibe um número significativamente maior de mutações do que as variantes anteriores (AKKIZ, 2022). Sendo 32 mutações localizadas na proteína Spike, local que determina a antigenicidade e infectividade do vírus, levantando assim, questionamentos em relação à eficácia das vacinas em limitar a propagação dessa variante (ZHANG et al., 2022).

Além das mutações exclusivas, as sublinhagens Omicron compartilham mutações com outras VOCs (Alpha, Beta, Gama e Delta), como del69–70, K417N, T478K, N501Y e P681R, que comprovadamente reduzem a sensibilidade do vírus à anticorpos neutralizantes (LI et al., 2021; GARCIA-BELTRAN et al., 2021), e aumentam a transmissibilidade viral (CALLAWAY, 2021). Logo, a variante Omicron pode ter um impacto negativo na eficácia de vacinas contra COVID-19 e conseqüentemente no aumento do número de novos casos e reinfecções (ZHANG et al., 2022).

### **1.6 Anticorpos específicos à SARS-CoV-2**

Anticorpos são moléculas compostas por três segmentos, dois fragmentos de união ao antígeno (Fab) e um fragmento cristalizável (Fc), unidos por uma região flexível. Estes segmentos são compostos por quatro cadeias polipeptídicas, sendo pares idênticos de cadeia pesada e leve, que se ligam entre si por pontes de dissulfeto e interações não covalentes (KENNETH et al., 2014).

A região do anticorpo que se liga ao antígeno, varia entre as moléculas de anticorpo, e por tanto é denominada região variável (V). Nas regiões variáveis encontra-se alças hipervariáveis, chamadas de regiões determinantes de complementariedade (CDRs), que determinam a especificidade dos anticorpos. A região constante (C), não apresenta alta variabilidade como a região variável, e determina o isotipo do anticorpo, classificando-os em cinco classes: imunoglobulina M (IgM), imunoglobulina D (IgD), imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina A (IgA) e imunoglobulina E (IgE) (ABBAS et al., 2015).

Anticorpos neutralizantes (nAbs) são os anticorpos capazes de interferir na ligação do patógeno com o receptor celular, inibindo assim, a capacidade de infectar o hospedeiro. Logo, possuem papel fundamental na imunidade protetora (PLOTKIN, 2008; PLOTKIN, 2010; AMANNA, MESSAOUDI e SLIFKA, 2008). Nab's foram descritos para diversos vírus, como: flavivírus (WU K.P. et al., 2003; GRIFFIN et al., 2019), vírus da doença de Newcastle (DINAPOLI, et al., 2007), papilomavírus (SLUPETZKY et al., 2007), rotavírus (WARD, 2009), inclusive contra coronavírus humanos, por exemplo, o MERS (TANG et al., 2014) e SARS-CoV (CAO et al., 2010).

Anticorpos podem ser gerados em resposta à várias proteínas do SARS-CoV-2, embora, a proteína Spike e o nucleocapsídeo sejam alvos mais eficazes da resposta humoral (ZHAO et al., 2020; LONG et al., 2020; PREMKUMAR et al., 2020; CHIA et al., 2020). Durante o curso

da infecção, os anticorpos direcionados à proteína Spike, especificamente ao RBD, são gerados antes do que os anticorpos contra o nucleocapsídeo (PREMKUMAR et al., 2020). Além disso, anticorpos em resposta ao RBD de SARS-CoV-2 podem fornecer maior especificidade em testes de diagnóstico, do que os anti-nucleocapsídeo, que demonstrou reatividade cruzada com SARS-Cov (CHIA et al., 2020; SUTHAR et al., 2020).

Anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2, visam reconhecer regiões dentro da Spike, principalmente, o RBD, e inibir a infectividade viral, através, principalmente, do bloqueio da interação entre vírus e ECA-2 (CHI et al., 2020; BROUWER et al., 2020; TORTORICI et al., 2020). Anticorpos neutralizantes direcionados à proteína Spike de SARS-COV-2, foram isolados e apresentaram epítomos de ligação distintos (ROGERS et al., 2020; ZOST et al., 2020; ROBBIANI et al., 2020; BROUWER et al., 2020; CAO et al., 2020; KREER et al., 2020; SEYDOUX et al., 2020; LIU L. et al., 2020). Com base na região de ligação em relação ao RBD, estes anticorpos podem ser classificados em quatro classes (BARNES et al., 2020a; GREANEY et al., 2021).

Os anticorpos de classe I são direcionados aos RBDs na conformação “up” (BARNES et al., 2020a), ou seja, quando o RBD se encontra em uma conformação na qual o sítio de interação é exposto permitindo a ligação do RBD ao receptor da célula hospedeira (WALLS et al., 2016; WRAPP et al., 2020). Anticorpos de classe I apresentam geralmente, cadeias pesadas codificadas pelo segmento gênico VH3-53 ou VH3-66 (BARNES et al., 2020a), com CDR H3 mais curtos do que o comprimento médio de anticorpos humanos (15 aa) (LEFRANC et al., 2015; BRINEY et al., 2019). Dentre os anticorpos previstos como de classe I pode se citar: CB6 (SHI, et al., 2020), COV21 (BARNES et al., 2020b), B38 (WU Y. et al., 2020), CV30 (HURLBURT et al., 2020), C105 (BARNES et al., 2020a), CC12.1 e CC12.3 (YUAN et al., 2020a).

Os anticorpos de classe II têm como alvo RBDs em conformação “up” ou “down”, na qual o sítio de ligação de RBD ao receptor celular ECA-2 está bloqueado (WALLS et al., 2016; WRAPP et al., 2020). Entre os anticorpos neutralizantes previstos como de classe II temos: C102, C144, C119, C121 (BARNES et al., 2020a) e COVA2-39 (WU N.C. et al., 2020). Alguns destes anticorpos apresentaram CDR H3 caracteristicamente longos (maior do que 15aa) e modos diferentes de interação com RBD, em comparação com os anticorpos de classe I (BARNES et al., 2020a; WU N.C et al., 2020).

Os Nabs de classe III se ligam ao RBD em sítios diferentes, não sobrepostos, ao sítio de ligação da ECA-2. Além de reconhecerem o RBD tanto em conformação “up”, quanto em conformação “down”. Estes anticorpos podem serem utilizados em combinações terapêuticas

com os anticorpos de classe I ou classe II, aumentando o repertório anti-Spike (BARNES et al., 2020a). Pode-se citar como anticorpos de classe III, o C135 (BARNES et al., 2020a) e S309 (PINTO et al., 2020). Os anticorpos, C110 e REGN610987, mostraram semelhanças com os nAbs de classe II e de classe III, ligando-se distalmente ao sítio de interação da ECA-2, porém interferindo estericamente na ligação com este receptor (BARNES et al., 2020a; HANSEN et al., 2020).

E por fim, os anticorpos neutralizantes de classe IV, que se ligam a RBDs somente em conformação “up” em epítomos fora do sítio de ligação da ECA-2, logo não bloqueiam a ligação entre RBD e ECA-2, sendo geralmente menos potentes que os anticorpos das outras classes (BARNES et al., 2020a; GREANEY et al., 2021). O anticorpo CR3022 é um anticorpo de classe IV, que não neutralizou o SARS-CoV-2 em ensaio *in vitro*, porém foi capaz de potencializar o efeito de anticorpos de outras classes (YUAN et al., 2020b).

## **1.7 Vacinas e anticorpos monoclonais contra COVID-19**

A principal estratégia de saúde pública para conter a propagação de COVID-19 é a vacinação (WHO, 2022). A imunização ativa, obtida por meio de vacinação é uma estratégia que simula uma infecção natural contra um patógeno específico, de modo a induzir uma resposta imunológica T-dependente e gerar uma imunidade eficaz e duradoura que proteja o indivíduo de futuras infecções (MOSER e LEO, 2010).

Devido à alta taxa de transmissão e a rápida disseminação mundial do SARS-CoV-2, houve urgência no desenvolvimento de medidas preventivas eficazes contra o vírus. Logo, vacinas contra COVID-19, foram desenvolvidas e aprovadas, em um prazo rápido, sem precedentes na história (LURIE et al., 2020).

A maioria das vacinas eficazes contra o SARS-CoV-2 visam induzir, contra subunidades virais, os denominados anticorpos neutralizantes. No caso do SARS-CoV-2, os anticorpos neutralizantes mais potentes têm como alvo a região do RBD, de modo a impedir a função do mesmo, a ligação entre vírus e receptores das células hospedeiras humanas (CADDY, 2020).

As vacinas desenvolvidas que apresentam maior interesse e aplicabilidade mundialmente, são: as vacinas de 1ª geração, de vírus inativado ou atenuado, Sinovac/CoronaVac, Bharat Biotech e Sinopharm; as de 2ª geração, com uso de vetor viral-adenovírus atenuado, AstraZeneca/Oxford, Sputnik V® e Ad26.COV2.S ou Janssen (Johnson

& Johnson); e as de 3ª geração, vacinas de ácidos nucleicos, Pfizer/BioNTech e Moderna (SERPA et al., 2021; COSTA ALMEIDA et al., 2021; VILELA FILHO et al., 2022). No Brasil, quatro dessas vacinas receberam autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e têm sido utilizadas nas campanhas vacinais: ButanVac, AstraZeneca/Oxford, Pfizer e Janssen (ANVISA, 2023).

Até o momento, um total de 13.168.935.724 doses de vacina foram administradas mundialmente (WHO, 2023a). As vacinas têm apresentado boa eficácia, contendo o aumento na incidência de casos, principalmente prevenindo o desenvolvimento de casos graves de COVID-19, e por tanto menores índices de internações e óbitos (SERPA et al., 2021).

Porém ainda há desafios no combate à doença, devido à opções limitada de tratamentos específicos para a doença, surgimento de variantes de SARS-CoV-2 que podem apresentar evasão aos anticorpos induzidos, além de indivíduos imunocomprometidos, que possam não desenvolver uma resposta robusta as vacinas (WONG e DAMANIA, 2021; KOENING et al., 2021).

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são anticorpos provenientes de um único clone de linfócito B, apresentando baixa toxicidade e imunogenicidade, alta especificidade e solubilidade (TILLER e TESSIER, 2015; CASTELLI, MCGONIGLE, HORNBY, 2019). Anticorpos monoclonais representam uma ferramenta valiosa para o desenvolvimento de terapias e tratamentos seguros e específicos para o COVID-19 (MAROVICH, MASCOLA, COHEN, 2020).

MAbs com ação neutralizante específicos para o SARS-CoV-2 têm sido estudados desde o início da pandemia (PESSOA, et al., 2020), bem como anticorpos monoclonais anti-citocinas para tentar reduzir a intensa resposta inflamatória desenvolvida por pacientes de COVID-19 em estado grave (LEONARDO e ANDRICOPULO, 2020).

Além do tratamento de doenças, os mAbs podem ser utilizados na imunoterapia passiva fornecendo uma imunização temporária (TAYLOR, et al., 2021), como reagentes em imunodiagnósticos (COSTA, 2019) e podem auxiliar no projeto e desenvolvimento de vacinas (MARSTON, PAULES, FAUCI, 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA

A rápida disseminação do SARS-CoV-2 e o elevado número de indivíduos infectados, implicam em altos níveis de replicação viral, e conseqüentemente, maior probabilidade de ocorrer mutações. Como resultado, novas variantes do SARS-CoV-2 têm sido detectadas (SHAHHOSSEINI, BABUADZE e KOBINGER, 2021). Dentre as variantes recentemente descobertas destaca-se a variante de preocupação Omicron (B.1.1.529) (CALLAWAY, 2021).

As sublinhagens Omicron contém um número de mutações significativamente maior do que as variantes identificadas anteriormente (KUMAR et al., 2022). Algumas dessas mutações têm sido associadas a maior transmissibilidade, aumento da infectividade e evasão de anticorpos neutralizantes (ZHOU, ZHI e TENG, 2022). Além disso, por apresentarem múltiplas mutações dentro do RBD, responsável pela entrada do vírus nas células hospedeiras, e alvo de vacinas e anticorpos terapêuticos, levanta-se questionamentos quanto a eficácia destes (ZHRADNÍK et al., 2021; LI et al., 2022).

Pesquisas demonstraram que algumas vacinas podem apresentar menor potencial neutralizante contra a Omicron (BA.1) (LIU et al., 2022). As variantes BA.4 e BA.5, demonstraram escape imunológico à anticorpos induzidos por infecção anterior de Omicron (BA.1), indicando possível mudança na antigenicidade dessas variantes (PLANAS et al., 2022; CAO et al., 2022).

Atualmente, métodos computacionais podem auxiliar no design de proteínas, e inclusive, têm sido empregados no desenvolvimento de terapêuticas contra COVID-19, como inibidores de peptídios e fragmentos direcionados ao RBD de SARS-CoV-2 (SITTHIYOTHA e CHUNSRIVITOT, 2021; RANGEL et al., 2021). Alguns estudos, através de design computacional, obtiveram anticorpos mutantes ou redesenhados, com maior afinidade de ligação ao RBD de SARS-CoV-2, o que sugere que possuem maior potencial neutralizante contra o vírus do que os anticorpos originais (TREEWATTANAWONG, SITTHIYOTA, e CHUNSRIVIROT, 2021; CHEN et al., 2021).

Portanto, este estudo visa, por meio de redesign computacional, otimizar um anticorpo neutralizante direcionado à RBD de SARS-CoV-2, de modo a obter anticorpos redesenhados com maior afinidade de ligação ao RBD das sublinhagens Omicron BA.4/5 e BA.5 BQ.1.1. Esperamos que os anticorpos remodelados sejam mais eficientes no combate às novas sublinhagens do SARS-CoV-2.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Redesenhar, por meio de abordagem computacional as regiões determinantes de complementariedade, de um anticorpo neutralizante específicos para o domínio de ligação ao receptor celular (RBD- Receptor-Binding Domain) de modo a aumentar a afinidade de ligação as sublinhagens Omicron, BA.4/5 e BA.5 BQ.1.1 de SARS-CoV-2.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Redesenhar computacionalmente as sequencias de aminoácidos dos CDRs do anticorpo CV30.
- Obter anticorpos redesenhados com maior afinidade de ligação  $\Delta G(\text{REU})$  computacionalmente calculada aos RBD das sublinhagens BA.4/5 e BA.5 BQ.1.1 de SARS-CoV-2;
- Realizar análises de ancoragem molecular (“docagem”) dos anticorpos redesenhados com o RBD das suas respectivas sublinhagens Omicron (BA.4/5, BA.5 BQ.1) de SARS-CoV-2.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Análise de sequências RBD, modelagem molecular e previsão estrutural

As sequências de aminoácidos do domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína Spike SARS-CoV-2 foram obtidas dos arquivos PDB descritos anteriormente: PDB 7CAK (Wuhan), 7WBP (BA1), 7XNR (BA2.13), 7XIY (BA.3) e 7XNQ (BA4). A sequência de aminoácidos do RBD da sublinhagem BA.5 foi obtida a partir do estudo científico publicado por CAO e colaboradores (CAO et al., 2022). Todas as sequências de RBD foram alinhadas usando o Clustal Omega Program (SIEVERS et al., 2011) e os aminoácidos diferenciais foram anotados manualmente na posição das respectivas mutações. As estruturas de RBD da proteína Spike de Wuhan e BA.1 foram geradas por modelagem molecular comparativa usando a plataforma Robetta (BAEK et al., 2021) e as sequências de aminoácidos disponíveis no Protein Data Base (PDB 7CAK [Wuhan] e 7WBP [BA.1]), foi utilizada como modelo, a estrutura molecular disponível para a proteína spike de SARS-CoV-2 (PDB 6VYB). Para os modelos estruturais de Wuhan e BA.1, as previsões estruturais foram estereoquímicas avaliadas usando a plataforma Molprobit Manchester (WILLIAMS et al., 2018) e as ferramentas PROCHECK por meio da plataforma SAVES v6.0 (LASKOWSKI et al., 1993). As estruturas foram visualizadas usando o software PYMOL (BADAWI et al., 2016) e os aminoácidos diferenciais das sublinhagens Omicron foram destacados na estrutura em fita da molécula RBD.

### 4.2 Seleção de modelos de anticorpos

Os modelos dos anticorpos específicos para RBD foram selecionados a partir de estudos anteriores (BARNES et al., 2020a; HURLBURT et al., 2020; WU N.C. et al., 2020; WU Y. et al., 2020; YUAN et al., 2020a) e classificados considerando a constante de afinidade (KD) ou  $\Delta G_{bind}$  (MM-GBSA) calculado computacionalmente. As sequências de aminoácidos das cadeias pesada e leve dos anticorpos C110 (PDB: 7K8P), CV30 (6XE1), CC12.3 (6XC4), C105 (6XCA), CC12.1 (8CWV), C144 (7K90), COVA2 -39 (7JMP), COVA2-04 (7JMO), B38 (7BZA) foram obtidas do Protein Data Bank (PDB; <https://www.rcsb.org/>). As sequências das regiões determinante de complementaridade (CDRs) do anticorpo CC12.3-D08 foram obtidas do artigo previamente publicado por Treewattanawon e colaboradores (TREWATTANAWON, SITTHIYOTHA, e CHUNSRIVIROT, 2021) e as regiões

flanqueadoras (regiões estruturais) foram selecionadas a partir do anticorpo parental CC12.3 previamente descrito por Yuan e colaboradores (YUAN et al., 2020a). As sequências de anticorpos foram alinhadas usando o Clustal Omega Program (SIEVERS et al., 2011) e as regiões determinantes de complementaridade (CDRs 1, 2 e 3) foram confirmadas usando a plataforma IMGT (<http://www.imgt.org>). As CDRs dos anticorpos CV30, C110 e CC12.3 foram usadas para análise posterior.

### **4.3 Cálculo do desvio quadrático médio (RSMD) por resíduo dos anticorpos**

As estruturas moleculares dos anticorpos CV30 (6XE1), C110 (7K8P), CC12.3 (6XC7) foram sobrepostas usando a ferramenta de alinhamento MatchMaker (Algoritmo Needleman-Wunsch com a matriz BLOSUM-62) disponível no software Chimera 1.16 (PETTERSEN et al., 2004). A coleta de dados RMSD dos alinhamentos de anticorpos foi realizada usando a ferramenta “RMSD:ca” usando Chimera 1.16 (PETTERSEN et al., 2004). Os dados do RMSD foram registrados e apresentados em formato de gráfico usando o software Excel versão 2016. As estruturas moleculares dos anticorpos CV30, C110, CC12.3 foram visualizadas usando o software PYMOL (BADAWI et al., 2016).

### **4.4 Redesenho computacional de proteínas**

O anticorpo CV30 foi escolhido para ser redesenhado computacionalmente, pois o anticorpo CV30 apresenta a capacidade de impedir a ligação do RBD à molécula de ECA2 e também leva à dissociação da subunidade S1, favorecendo a neutralização viral (HURLBURT et al., 2020). A estrutura do anticorpo CV30 complexada com Wuhan SARS-CoV-2 RBD (PDB: 6XE1) foi usada como modelo para redesenhar os anticorpos específicos para RBD das sublinhagens Omicron BA.4/5 e BA.5 BQ.1.1 de SARS-CoV-2. A plataforma RosettaAntibodyDesign (RAbD) (ADOLF-BRYFOGLE, 2018) foi empregada para redesenhar as CDR H1, H2 e H3 (cadeia pesada) e as CDR L1, L2 e L3 (cadeia leve) do anticorpo CV30. O banco de dados avaliável de PyIgClassify (<http://dunbrack2.fccc.edu/pyigclassify>) foi usado em RAbD para classificações estruturais das CDRs em cada cadeia. O protocolo RAbD consiste em ciclos de Monte Carlo externos e internos para redesenhar as sequências de anticorpos. As mudanças estruturais das CDRs foram energeticamente minimizadas e 1000 execuções

independentes foram realizadas em cada análise computacional. A energia livre de ligação ( $\Delta G_{\text{bind}}$  [Rosetta]) de cada conformação projetada foi calculada em Rosetta Energy Unit (REU). As sequências/conformações projetadas com  $\Delta G_{\text{bind}}$  [Rosetta] < -40,0 REU (ADOLF-BRYFOGLE, 2018) foram escolhidas para análise posterior. Os complexos RBD e anticorpo e as interações da interface RBD-anticorpo foram visualizados usando o software Chimera X 1.5 (PETTERSEN et al., 2021).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise de RBD das sublinhagens de SARS-CoV-2 Omicron

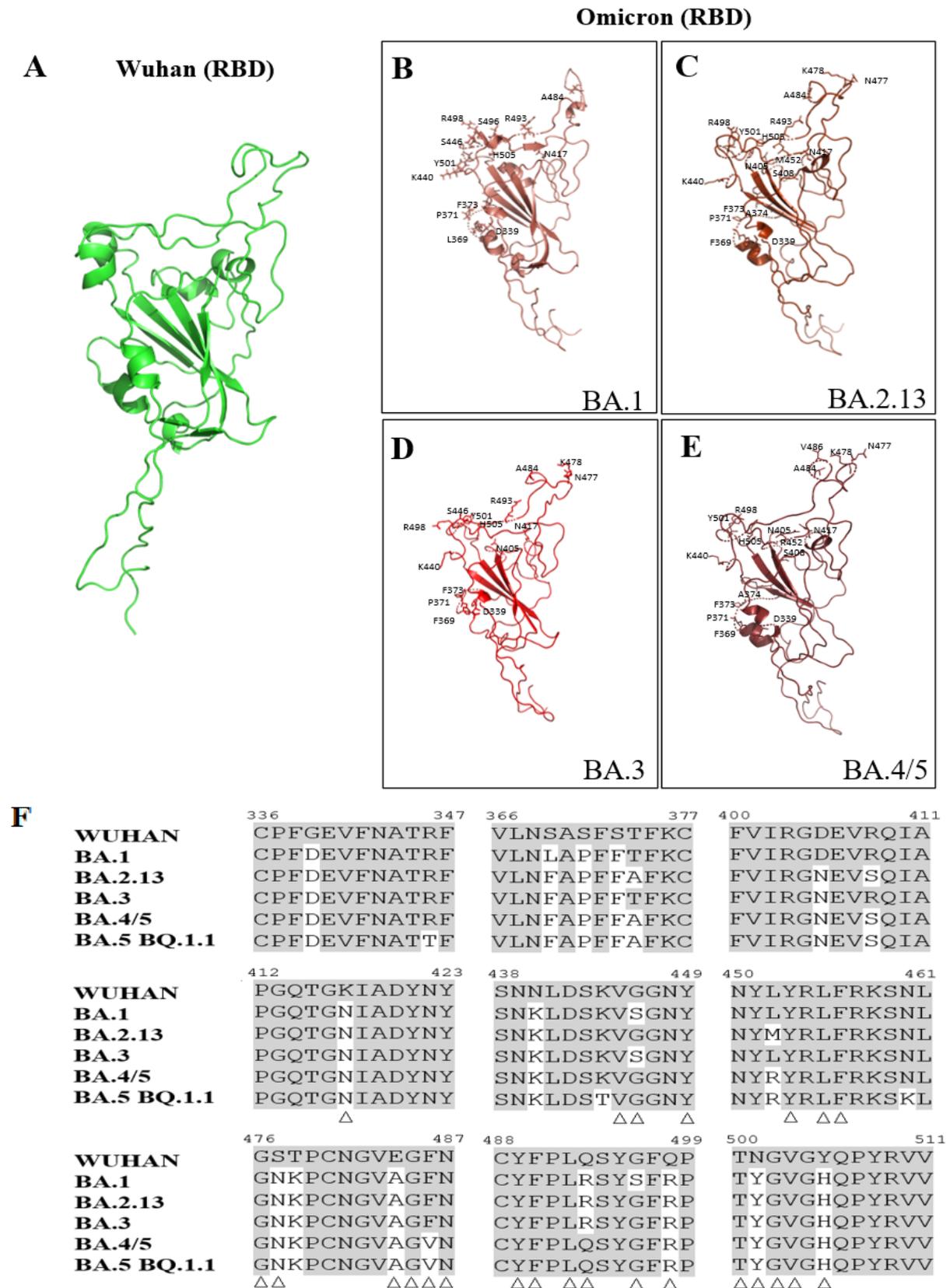
As estruturas moleculares em fita dos RBD derivados de SARS-CoV-2 de Wuhan, de BA.1, BA.2.13, BA.3, BA.4/5 são demonstrados na **Figura 3A-3E**. Os aminoácidos diferenciais em comparação com sequência de RBD de Wuhan são indicados nas estruturas em fita da molécula RBD das sublinhagens de Omicron de SARS-CoV-2 (**Fig.3B-3E**). As mutações observadas nos RBDs das sublinhagens produzem ligeiras modificações estruturais na forma do RBD quando comparadas com ao RBD-SARS-CoV-2 de Wuhan, mutações, as quais, podem estar associadas ao aumento de infectividade e/ou fuga de anticorpos neutralizantes.

Trechos do alinhamento das sequências de aminoácidos expressas nas sublinhagens Omicron de SARS-CoV-2 demonstram numerosas mutações pontuais no domínio de ligação ao receptor (319-541aa) em comparação com o RBD-SARS-CoV-2 de Wuhan (**Fig.3F**). Nas sublinhagens Omicron BA.1 e BA.3 exibem 15 mutações, das quais compartilham 13 substituições: G339D, S371P, S373F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y, Y505H. A substituição de glicina (G) na posição 446 por serina (S) é exclusivamente expressa pelas sublinhagens BA.1 e BA.3 (**Fig.3F**).

A sublinhagem BA.2.13 apresenta 17 mutações dentro da sequência de aminoácidos da RBD, incluindo as substituições T376A, D405N, R408S, L452M, N501Y em comparação com a sequência de Wuhan RBD SARS-CoV-2. A substituição L452M é exclusivamente expressa por sublinhagens BA.2, enquanto a mutação D405N é fixada em sublinhagens subsequentes de Omicron (**Fig.3F**).

BA.4 e BA.5 expressam sequências de aminoácidos idênticas dentro da RBD e são denominadas ao longo do texto como BA.4/5. As sublinhagens BA.4/5 compartilham 17 mutações em comparação com Wuhan RBD SARS-CoV-2 e também exibem duas mutações únicas, L452R e F486V. Uma substituição de reversão, Q493R, também é observada nas sublinhagens BA.4/5.

Desde que foi identificada, a sublinhagem Omicron BA.5 BQ.1, tem sido associada a um aumento de casos em todo o mundo, e, portanto, foi incluída em nossa análise. A sequência de aminoácidos da RBD derivada da sublinhagem BA5 BQ.1.1 é semelhante à sua sublinhagem parental BA.5, no entanto, a BA5 BQ.1.1 se diferencia da linhagem parental por apresentar três mutações adicionais, sendo, R346T, K444T e N460K.



**Figura 3: Análise do RBD de sublinhagens Omicron de SARS-CoV-2. A-E.** Estruturas tridimensionais dos RBDs de SARS-CoV-2-Wuhan(A) e sublinhagens Omicron BA.1(B), BA.2.13(C), BA.3(D), BA.4/5(E). Os aminoácidos diferenciais expressos nas sublinhagens Omicron são destacados na estrutura do RBD em fita. **F.** Trechos do alinhamento das sequências de aminoácidos dos RBDs de SARS-CoV-2-Wuhan e sublinhagens Omicron (BA.1; BA.2.13; BA.3; BA.4 e BA.5; BA.5 BQ.1.1). Aminoácidos conservados, em relação ao RBD de Wuhan, são destacados em cinza. Os resíduos que interagem com o ACE2 são indicados por triângulos.

Todas as sublinhagens Omicron apresentaram mutações substanciais no RBD em comparação a sequência original de SARS-CoV-2 de Wuhan. A análise geral das sequências demonstrou que onze (11) mutações são comumente compartilhadas por todas as sublinhagens de ômicron, das quais 6 localizam-se na região do motivo de ligação ao receptor (RBM) (437-508 aa) coincidindo com a interface de ligação ECA2, indicando possível mudança na antigenicidade dessas sublinhagens em comparação com SARS-CoV-2 Wuhan.

## 5.2 Seleção e análise de anticorpos

Dez anticorpos com especificidade de ligação à RBD de SARS-CoV-2 (CC110, CV30, CC12.3, CC12.3-D8, CC105, CC12.1, C144, COVA-39, COVA-04 e B38) foram selecionados e classificados com base em sua constante de afinidade (KD) ou  $\Delta G_{bind}$  (MM-GBSA) calculado computacionalmente. Conforme indicado na **Tabela 1**, a constante de afinidade de 9 de 10 anticorpos monoclonais (mAbs) selecionados variou de 1,3 nM a 70 nM. Os anticorpos C110, CV30 e CC12.3 apresentaram as melhores constantes de afinidade entre os anticorpos selecionados, de 1.3 nM, 3.6 nM e 14 nM, respectivamente.

**Tabela 1: Características e Referências dos anticorpos selecionados**

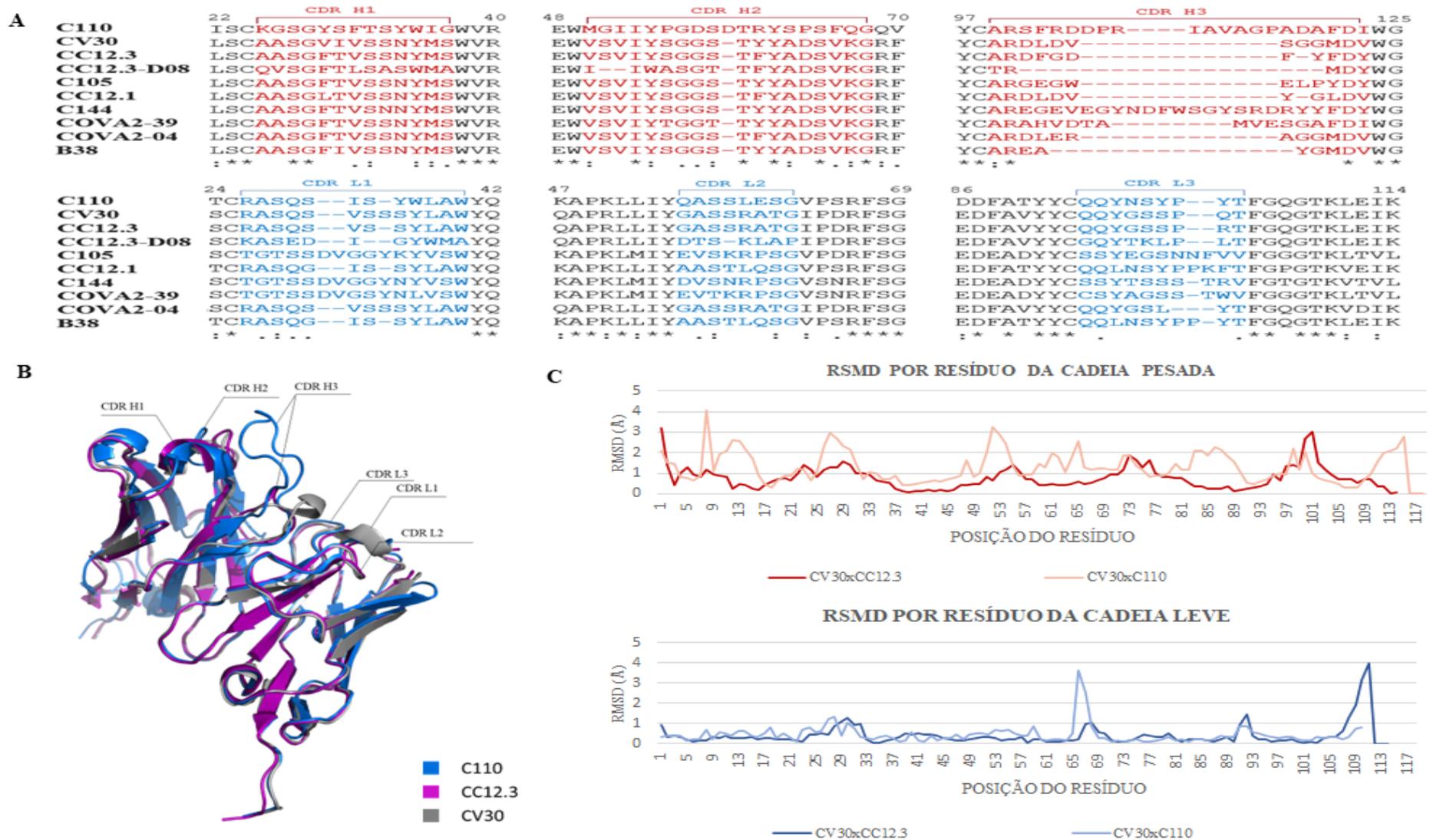
Nome anticorpo	Constante afinidade (KD)	Ligação $\Delta G$ (REU)	Ligação $\Delta G$ (MM-GBSA)	Referência
C110	1.3 nM	-	-	BARNES et al., 2020a
CV30	3.6 nM	-	-	HURLBURT et al., 2020
CC12.3	14 nM	-	- 24,0 $\pm$ 0,5 kcal/mol	YUAN et al., 2020a
CC12.3-D08	-	- 43,4 REU	- 96,5 $\pm$ 0,4 kcal/mol	TREEWATTANAWONG et al., 2020
C105	14 nM	-	-	BARNES et al., 2020a
CC12.1	17 nM	-	-	YUAN et al., 2020a
C144	18 nM	-	-	BARNES et al., 2020a
COVA2-39	21 nM	-	-	WU NC., 2020
COVA2-04	40 nM	-	-	
B38	70 nM	-	-	WU Y., 2020

Valores das constantes de afinidade (KD), ligação  $\Delta G$  (Unidade de Energia Rosetta), e ligação  $\Delta G$  (MM-GBSA); e referências dos anticorpos selecionados na literatura: C110, CV30, CC12.3, CC12.3 D-08, C105, CC12.1, C144, COVA2-39, COVA2-04, B38.

O alinhamento das CDRs de cadeias pesadas e leves de anticorpos revelou um perfil semelhante de sequências de aminoácidos dentro de CDR H1 e CDR H2, e sequências divergentes dentro da CDR H3 dos anticorpos selecionados. Sequências de aminoácidos particularmente longas de CDR H3 foram observadas nos anticorpos C144 (25 aa), C110 (21 aa) e COVA2-39 (17 aa). Uma variabilidade de aminoácidos relativa também foi observada nas CDRs L1, L2 e L3 de todos os anticorpos analisados, embora alguns mAbs compartilhem CDR Ls comuns (**Fig.4A**).

As estruturas moleculares dos anticorpos C110, CV30 e CC12.3, com os melhores valores de constantes de afinidade (KD), considerados os mais promissores, foram sobrepostas (**Fig.4B**). As estruturas dos anticorpos apresentam maior variabilidade nas regiões referentes às CDRs. Os anticorpos CC12.3 e CV30 demonstram melhor sobreposição, e C110 mAb apresenta maior variabilidade na estrutura em comparação com os outros dois anticorpos. A longa CDR H3 do anticorpo C110 se destaca na estrutura visualizada. Na análise de RMSD (**Fig.4C**) o anticorpo C110 apresentou maiores valores de RMSD(Å) por resíduo, indicando maior variabilidade das sequências de aminoácidos da cadeia pesada e leve do anticorpo C110 em relação ao CV30.

O C110 mAb mostrou semelhanças com anticorpos neutralizantes de classe 2 e classe 3, ligando-se distalmente ao motivo de ligação da ECA-2, possivelmente interferindo estericamente com esta interação (BARNES, et al., 2020a). O anticorpo específico para RBD CV30 é capaz de produzir forte afinidade neutralizante, com sítios de interação coincidentes com os de ligação da ECA-2. Portanto, o anticorpo CV30 foi escolhido como um modelo a ser reprojeto computacionalmente para melhorar a afinidade de ligação às sublinhagens SARS-CoV-2 Omicron.



**Figura 4: Comparação dos anticorpos específicos para RBD. A.** Alinhamento de seqüências de CDRs de cadeias pesadas e leves de anticorpos. As seqüências de aminoácidos das CDRs H1, H2 e H3 (cadeias pesadas) estão indicadas em vermelho e as CDRs L1, L2 e L3 (cadeias leves) estão indicadas em azul. Aminoácidos idênticos são indicados com asterisco. Os dois pontos e os pontos indicam a conservação de aminoácidos entre grupos de propriedades fortemente ou fracamente semelhantes, respectivamente. **B.** Alinhamento estrutural dos domínios variáveis (Fv) dos anticorpos CV30 (cinza), C110 (azul) e CC12.3 (roxo). **C.** Cálculo de RSMD por resíduo de aminoácido das cadeias pesadas (acima) e leve (abaixo). As linhas vermelho e azul escuros, vermelho claro e azul claro são referentes, respectivamente, aos mAbs CC12.3 e C110, em comparação com o anticorpo CV30.

### 5.3 Redesenho computacional de anticorpos específicos à RBD de sublinhagens Omicron

Os CDRs do anticorpo CV30 foram computacionalmente redesenhados com o objetivo de melhorar a afinidade de ligação com o RBD derivados das sublinhagens BA.4/5 e BA.5 BQ.1.1. (**Fig.5**). Os anticorpos com valores  $\Delta G_{bind}$  [Rosetta] mais baixos para cada sublinhagem foram nomeados selecionados das análises computacionais e nomeados como anticorpos derivados do anticorpo CV30 com a seguinte nomenclatura CV30 BA.4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1 (**Fig.5A**). Os anticorpos redesenhados, CV30 BA.4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1 mAbs apresentaram  $\Delta G_{bind}$  (Rosetta) calculado computacionalmente de  $-56,8$  REU e  $-52,5$  REU, respectivamente.

O alinhamento das sequências dos mAbs CV30, CV30 BA.4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1 demonstrou uma menor modificação de aminoácidos dentro da CDR H1, com 6 substituições observadas para CV30 BA.4/5 e 5 para CV30 BA.5 BQ.1.1, respectivamente. A CDR H2 do mAb CV30 BA.4/5 apresenta 6 modificações de aminoácidos e uma inserção adicional de arginina (R) na posição 58. Da mesma forma, foram observadas 6 modificações de aminoácidos e uma inserção adicional de alanina (A) na posição 58 (**Fig. 5A**) para CV30 BA.5 BQ.1.1 mAb.

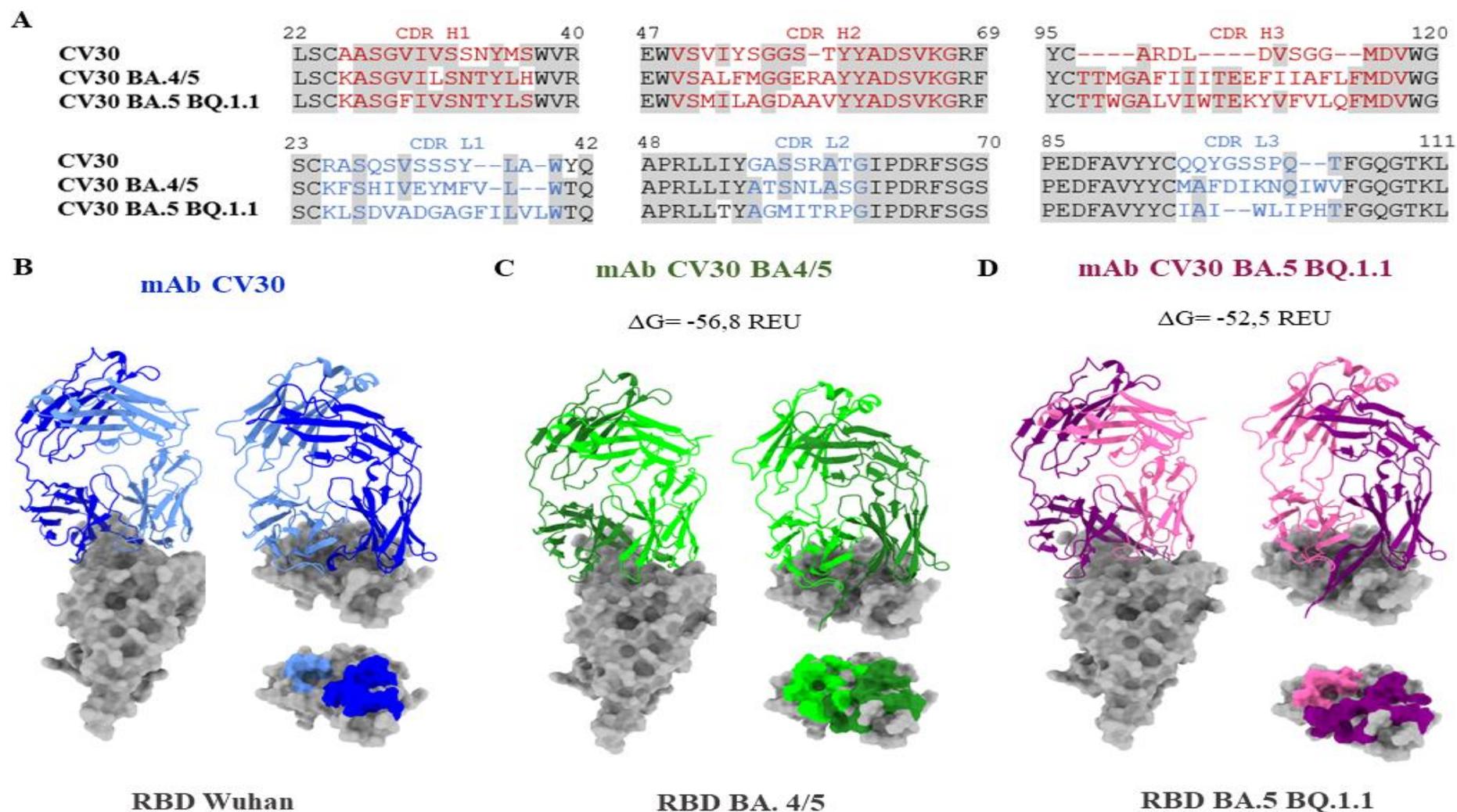
O alinhamento das sequências do CDR H3 dos anticorpos CV30 BA.4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1 demonstrou que as maiores modificações ocorrem entre os CDRs H3, com várias substituições de aminoácidos nesta região e ainda a inserção de 10 aminoácidos (posições 97-100, 105-108 e 114-115). Aminoácidos idênticos foram observados apenas nas posições 101(A) e 116-118 (MDV) dentro da sequência CDR H3.

A análise das CDR Ls demonstra uma ampla variação de aminoácidos em diversas posições das CDR L1, L2 e L3. Aminoácidos idênticos dentro de CDR L1 foram verificados apenas nas posições 27 (S), 37 (L) e 40 (W) para CV30 e mAbs derivados de CV30. Da mesma forma, apenas uma glicina (G) na posição 62 da CDR L2 é a mesma observada entre os três anticorpos analisados. Não foram observados aminoácidos idênticos na CDR L3 dos três anticorpos analisados (CV30, CV30 BA.4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1). Além disso, duas inserções de aminoácidos no CDR L3, posições 102 e 103, foram observadas nos anticorpos redesenhados (CV30 BA.4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1) (**Fig. 5A**).

A análise das CDR Ls demonstra uma ampla variação de aminoácidos em diversas posições das CDR L1, L2 e L3. Aminoácidos idênticos dentro de CDR L1 foram verificados apenas nas posições 27 (S), 37 (L) e 40 (W) para CV30 e mAbs derivados de CV30. Da mesma forma, apenas a glicina (G) na posição 62 da CDR L2 é a mesma entre os três anticorpos analisados. Não foram observados aminoácidos idênticos na CDR L3. Além disso, duas

inserções de aminoácidos no CDR L3, posições 102 e 103, foram observadas exclusivamente para o CV30 BA.4/5 mAb.

A visualização dos anticorpos redesenhados complexos com RBD demonstra claramente um aumento da área de interface RBD-anticorpo em comparação com a área de interface de CV30 complexado com RBD de Wuhan. Assim, os anticorpos resenhados (CV30 BA.4/5 mAb; CV30 BA.5 BQ.1.1 mAb) melhoram a ligação a BA.4, BA.5 e às novas sublinhagens SARS-CoV-2 Omicron BA.5 BQ.1.1 (**Fig. 5B-5D**).



**Figura 5: Redesenho computacional do mAb CV30 específico para RBD.** A. Alinhamento das sequências de aminoácidos das cadeias pesada e leve de anticorpos CV30 e derivados (CV30 B4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1). As CDRs H1, H2 e H3 (cadeias pesadas) e L1, L2 e L3 (cadeias leves) são indicadas em vermelho e azul, respectivamente. Aminoácidos idênticos são destacados em cinza. A numeração dos aminoácidos foi modificada para levar em conta os aminoácidos adicionais incorporados computacionalmente nos derivados do anticorpo CV30. **B-D.** Estruturas gerais mAbs de CV30 (azul), CV30 B4/5 (verde) e CV30 BA.5 BQ.1.1 (lilás) complexados com os respectivos RBDs (Wuhan, BA.4/5 e BA.5 BQ.1.1 SARS-CoV-2). As cadeias pesadas e leves de anticorpos são mostradas em cores claras e escuras. As respectivas RBDs de SARS-CoV-2 de Wuhan e sublinhagens Omicrons são mostrados em cinza. Os complexos de estrutura geral são exibidos como vista lateral (direita) e superior (superior à esquerda). Os epítomos RBD são destacados nas respectivas cores (parte inferior esquerda). As superfícies RBD que interagem com as cadeias pesadas e leves de anticorpos são indicadas com cores escuras e claras, respectivamente.

## 6. DISCUSSÃO

A solução terapêutica mais eficaz contra a disseminação do SARS-CoV-2 é interromper a ligação e consequente entrada do vírus nas células humanas, por meio de anticorpos neutralizantes direcionados à spike, ou mais especificamente, ao RBD (YANG e DU, 2021). Desde o início da pandemia, potentes anticorpos neutralizantes foram isolados (BARNES et al., 2020a; HURLBURT et al., 2020; WU N.C. et al., 2020; WU Y. et al., 2020; YUAN et al., 2020a)

Um estudo experimental isolou de um paciente infectado com SARS-CoV-2, um anticorpo monoclonal neutralizante específico para RBD, o CV30. O anticorpo neutralizou pseudovírus com um IC<sub>50</sub> de 0,03 µg/ml (SEYDOUX et al., 2020), ligou-se ao RBD-SARS-CoV-2 com um KD de 3,6 nM e possui sítio de ligação semelhante ao da ECA-2 (HURLBURT et al., 2020).

No entanto, com o aumento de variantes preocupantes, como as sublinhagens Omicron, muitos dos anticorpos utilizados podem não ser tão eficazes, uma vez que as inúmeras mutações identificadas podem resultar em efeitos negativos à sua neutralização (IKETANI et al., 2022).

Como observado em nosso estudo, as sublinhagens Omicron possui um número elevado de mutações na região do RBD em comparação com Wuhan, inclusive, maior número de mutações do que relatado nas variantes anteriores. Algumas das mutações presentes nas sublinhagens Omicron também foram identificadas anteriormente em outras VOCs e comprovadamente foram associadas ao aumento da infectividade, carga viral, transmissibilidade e evasão imune.

Estudos *in silico* indicaram que sublinhagens Omicron demonstram maior afinidade de ligação com ECA-2 do que a variante Delta (GENOVESE et al., 2021; RATH, PADHI e MANDAL, 2022), sendo a variante Delta altamente infecciosa, 60% mais transmissível do que a variante Alpha (MAHASE, 2021). Zhou, et al (2022), demonstrou que as sublinhagens Omicron possuem superfície eletrostática mais positiva do que outras VOCs, justificando maior interação e afinidade de ligação com ECA-2, de superfície eletrostática negativa.

As principais mutações com consequências na funcionalidade de anticorpos, e associadas ao aumento da infectividade viral e afinidade de ligação do RBD com ECA-2, estão localizadas nas posições: N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y e Y505H (ZHOU, ZHI, TENG, 2023). Todas essas mutações estão presentes nas sublinhagens Omicron analisadas, exceto a mutação Q493R, ausente nas sublinhagens BA.4/5 e BA.5 BQ.1.1.

Um estudo demonstrou que a substituição F486V presente em BA.4/5, reduz a afinidade dos RBDs dessas sublinhagens com a ECA-2, devido a menor número de interações

hidrofóbicas, enquanto a mutação de reversão R493Q restaura uma ligação de hidrogênio, aumentando a afinidade entre os RBD e a ECA-2 (WANG Q., 2022).

Estudos relataram neutralização *in vitro*, induzida por vacina e infecção prévia por SARS-CoV-2, menor contra BA.4/5 do que contra sublinhagens Omicron anteriores (HACHMANN et al., 2022; QU et al., 2023; CAO et al., 2022; TEGALLY et al., 2022; KHAN et al., 2022; WANG Q. et al., 2022). As mutações K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, e N501Y demonstraram prevenir a neutralização por alguns mAbs, soros de pacientes convalescentes e soro pós-vacinal (THOMPSON et al., 2021; ZHOU e WANG, 2021). Observa-se que as mutações nestas posições estão sendo conservadas nas sublinhagens Omicron. Além da busca por maior infectividade e transmissibilidade, a evolução viral também é impulsionada por escape imunológico (CUI et al., 2022).

As mutações exclusivas de BQ.1.1, R346T e K444T, estão localizadas fora do RBM, porém são alvo de anticorpos neutralizantes de classe III. Outra mutação exclusiva, N460K, é caracterizada como a principal mutação responsável por evasão de anticorpos neutralizantes. A mutação F486V, mutação também presente nessa sublinhagem, localiza-se dentro do RBM, caracterizando-se como resíduo chave para ligação tanto com a ECA-2 quanto com anticorpos neutralizantes classe I e II (WANG Q. et al., 2022). Logo, a combinação dessas mutações, R346T, K444T, N460K e F486V, na sublinhagem BQ.1.1, bem como em outras sublinhagens, BA4.6, BF.7 e BA2.75.2 (QU et al., 2022), é crítica, contribuindo com maior infectividade do vírus e resistência à neutralização por anticorpos.

Considerando a possível mudança de antigenicidade das sublinhagens Omicron e a capacidade de evasão imunológica demonstrada por elas, redesenhar anticorpos neutralizantes que sejam específicos para RBD de sublinhagens Omicron pode representar uma ferramenta valiosa em resposta às recentes ondas de casos associados à essas sublinhagens. Os anticorpos reprojatados neste trabalho, CV30 BA.4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1, apresentaram melhor capacidade de ligação prevista por análises computacionais ao RBD das respectivas sublinhagens avaliadas, em comparação que o anticorpo parental CV30, com ligação  $\Delta G(\text{Rosetta})$  de  $-56,8$  REU, e  $-52,5$  REU, respectivamente.

O anticorpo CC12.3 foi redesenhado computacionalmente por Treewattanawong e colaboradores, gerando nove potenciais anticorpos neutralizantes com melhores afinidades de ligação previstas para RBD-SARS-CoV-2. O anticorpo considerado pelo estudo como mais promissor, o CC12.3 D8 obteve valor de ligação  $\Delta G(\text{Rosetta})$  de  $-43,4$  REU e de dinâmica molecular por MM-GBSA de  $-24,0 \pm 0,5$  kcal/mol (TREEWATTANAWONG, SITTHIYOTHA e CHUNSRIVIROT, 2021).

Entre os CDRs dos anticorpos redesenhados em nosso trabalho, as CDR H3s redesenhadas apresentaram maiores modificações, incluindo a inserção de até 10 aminoácidos. Em ambos os anticorpos redesenhados, CV30 BA.4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1, as sequências de CDR H3 apresentam 22 aminoácidos, sendo classificadas como CDR H3 longas.

Anticorpos neutralizantes humanos (hNAbs) codificado pelo gene IGHV3-53 geralmente apresentam caracteristicamente CDR H3s curtos. No entanto, potentes anticorpos neutralizantes com CDR H3 longas (> 15 resíduos) (LEFRANC, 2011) e que visam o RBD de SARS-CoV-2 foram relatados (BARNES et al., 2020a; WU N.C. et al., 2020).

O C110 mAb tem um longo CDRH3 com 21 resíduos e uma constante de equilíbrio (KD) de 1,6 nM. Outro mAb isolado, o C144, possui uma CDRH3 com 25 resíduos e apresentou forma diferente de se ligar ao RBD, bloqueando a spike em uma conformação fechada de pré-fusão, impossibilitando a abertura do Spike para interação com a ECA- 2 (BARNES et al., 2020a). Outro estudo comparou dois anticorpos, COVA2-04 e COVA2-39, que apresentam, respectivamente, CDR H3 com 12 e 17 resíduos, e KD de 40 nM e 21 nM. O COVA2-39, devido ao seu longo CDR H3, demonstrou um mecanismo de ligação ao RBD diferente do COVA2-04 e outros anticorpos (CC12.1, CC12.3, B38, CV30 e C105), resultando em diferentes interações moleculares com o RBD (WU N.C. et al., 2020).

Quanto às CDRLs, os anticorpos projetados demonstram uma ampla variação de aminoácidos em diferentes posições das CDRs L1, L2 e L3. Curiosamente, o estudo de redesenho do anticorpo CC12.3 indicou que o aumento das afinidades dos anticorpos redesenhados foi uma consequência do aumento das interações entre as cadeias leves redesenhadas e o RBD, sugerindo que os CDRLs são alvos de projeto promissores para aumentar a afinidade de ligação ao RBD-SARS-CoV-2 (TREEWATTANAWONG, SITTHIYOTHA e CHUNSRIVIROT, 2021).

Futuros estudos de dinâmica molecular e dados experimentais são necessários para um melhor entendimento dos anticorpos projetados neste trabalho. No entanto, nossos resultados sugerem que os anticorpos redesenhados devem ser capazes de se ligar ao SARS-CoV-2-RBD das sublinhagens BA.4/5 e BA.5 BQ.1.1 melhor do que o mAb CV30 parental.

## 7. CONCLUSÃO

Por meio de redesign computacional de proteínas, projetamos anticorpos potencialmente neutralizantes específicos para RBD das sublinhagens BA.4/5 e BA.5 BQ.1.1, usando o anticorpo CV30 como modelo. CV30 BA.4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1 são os anticorpos redesenhados computacionalmente, com as melhores afinidades de ligação  $\Delta G$  (Rosetta) previstas para as respectivas sublinhagens Omicron. O aumento demonstrado na área de interface entre os anticorpos CV30 BA.4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1 e os RBDs de BA.4/5 e BA5 BQ.1.1, respectivamente, suporta os dados computacionais de afinidades mais altas de ligação dos anticorpos modificados com as RBDs das subvariantes Omicron. Os anticorpos redesenhados, CV30 BA.4/5 e CV30 BA.5 BQ.1.1 são candidatos promissores que podem ser usados como anticorpos neutralizantes visando linhagens recentes de SARS-CoV-2.

## 8. ANEXO

Tabela 2: Nomenclatura dos aminoácidos e seus respectivos códigos (1 letra)

AMINOÁCIDO	CÓDIGO (1 LETRA)
ALANINA	A
ARGININA	R
ASPARAGINA	N
ÁCIDO ASPÁRTICO	D
CISTEINA	C
ÁCIDO GLUTÁMICO	E
GLUTAMINA	Q
GLICINA	G
HISTIDINA	H
ISOLEUCINA	I
LEUCINA	L
LICINA	K
METIONINA	M
FENILALANINA	F
PROLINA	P
SERINA	S
TREONINA	T
TRYPTÓFANO	W
TIROSINA	Y
VALINA	V

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., et al. **Anticorpos e Antígenos**. In: ABBAS, A.K., et al. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª Edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. Pg.87-106.
- ACKERMANN, M, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. **The New England journal of medicine**. vol. 383(2), p.120-128, 2020. doi:10.1056/NEJMoa2015432
- ADOLF-BRYFOGLE, J., *et al.* RosettaAntibodyDesign(RAbD):A general frame work for computational antibody design. **PLoS Comput. Biol.** vol14, e1006112, 2018. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006112.
- AKKIZ, H. The Biological Functions and Clinical Significance of SARS-CoV-2 Variants of Concern. **Frontiers in medicine**. Sec. Infectious Diseases – Surveillance, Prevention and Treatment vol 9, 849217, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.849217>.
- ALBUQUERQUE, A.C.B., *et al.* A Tempestade de citocinas na covid-19: uma revisão narrativa. **Revista Multidisciplinar Em Saúde**, vol.2 (2), p.23, 2021. DOI: <https://doi.org/10.51161/rem/964>
- ALEEM, A. *et al.*. Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19) In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls; 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570580/>
- COSTA ALMEIDA, S.L.A. *et al.* A critical analysis of the vaccines available for Sars-cov-2. *Brazilian Journal of Health Review*, Vol.4 (2), p.4537–4555. <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n2-044>.
- AMANNA, I.J., MESSAOUDI, I., SLINFKA, M.K.. Protective immunity following vaccination: how is it defined? **Human vaccines**. vol.4,4; p.316-9, 2008. doi:10.4161/hv.4.4.5751
- ANVISA. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Vacinas - Covid-19/ Vacinas aprovadas. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas>. Acesso em: 20 de janeiro de 2023
- AZHUR, AK, *et al.* Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy**. Vol.75(7), p.1564-1581, 2020. doi:10.1111/all.14364
- BADAWI, M.M., *et al.* Predication and in silico Modeling of Epitope-Based Peptide Vaccine Against virulent Newcastle Disease Viruses. **American Journal of Infectious Diseases and Microbiology**. Vol.4 (3), p.61-71, 2016. doi: 10.12691/ajidm-4-3-3.
- BAEK, M., *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. **Science**. Vol.373, p.871–876, 2021. <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>
- BARNES, C.O. *et al.* SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. **Nature**, vol.588, p.682–687, 2020a. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2852-1>

BARNES, C.O. *et al.* Structures of Human Antibodies Bound to SARS-CoV-2 Spike Reveal Common Epitopes and Recurrent Features of Antibodies. **Cell**, vol.182, p.828–842 e16, 2020b. doi:10.1016/j.cell.2020.06.025

BRINEY, B, *et al.* Commonality despite exceptional diversity in the baseline human antibody repertoire. **Nature**. Vol 566, p.393–397; 2019. doi:10.1038/s41586-019-0879-y

BROUWER, P.J.M., *et al.* Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. **Science** vol.369, p.643–650; 2020. doi:10.1126/science.abc5902

BROZ, P. & DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature reviews. Immunology**. vol. 16,7, p.407-20, 2016. doi:10.1038/nri.2016.58

BUTOWT, R., BILINSKA, K e VON BARTHELD, C. Why does the omicron variant largely spare olfactory function? Implications for the Pathogenesis of Anosmia in Coronavirus Disease. **The Journal of infectious diseases**. vol. 226,8, p.1304-1308, 2020. doi:10.1093/infdis/jiac113

CADDY, S. “Developing a vaccine for covid-19.” **BMJ** (Clinical research ed.) vol. 369, p1790; 2020. doi:10.1136/bmj.m1790

CÂNDIDO, R.F.L. **Alterações hematológicas associadas à COVID-19 em pacientes sintomáticos**. Monografia (Graduação em Biomedicina). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

CALLAWAY, E. Beyond Omicron: what’s next for SARS-CoV-2 evolution. **Nature**. vol. 600, p.204-207, 2021. doi:10.1038/d41586-021-03619-8

CAO, Z., *et al.* Potent and persistent antibody responses against the receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein in recovered patients. **Virology jornal**, vol.7, 299, 2010, doi:10.1186/1743-422X-7-299

CAO, Y., *et al.* Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients’ B cells. **Cell** vol. 182,1, p.73-84.e16. 2020. doi:10.1016/j.cell.2020.05.025

CAO, Y. *et al.* BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. **Nature**, vol 608, p.593–602, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04980-y>

CARVALHO, P.P.D. **Caracterização da interação dos coronavírus SARS-CoV e SARS-CoV-2 com o receptor ACE2 por meio de um padrão evolutivo conservado de aminoácidos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2020. doi:10.11606/D.59.2021.tde-24082021-145318.

CASCELLA, M., *et al.* Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). **StatPearls** [Internet]; PMID: 32150360; 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>.

CASTELLI, M.S., MCGONIGLE, P., HORNBY, P.J. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. **Pharmacol Res Perspect.** vol. 7,6 (2019): e00535. doi:10.1002/prp2.535

CHEN, L., *et al.* Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. **The Lancet. Infectious diseases**, vol. 20,4, p.398-400, 2020. doi:10.1016/S1473-3099(20)30141-9

CHEN, J., *et al.* Rational optimization of a human neutralizing antibody of SARS-CoV-2. **Comput Biol Med.** Vol.135, 104550, 2021. doi:10.1016/j.compbiomed.2021.104550

CHI, X., *et al.* A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. **Science.** Vol.84, p. 650-655, 2020. 10.1126/science.abc6952

CHIA, W.N., *et al.* Serological differentiation between COVID-19 and SARS infections, **Emerg. Microb. Infect.**, vol.9, p.1497-1505, 2020. 10.1080/22221751.2020.1780951

CONTI, P., *et al.* Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. **Journal of biological regulators and homeostatic agents** vol. 34,2, p.27-331, 2020. doi:10.23812/CONTI-E

COOPERSMITH C.M, *et al.* The Surviving Sepsis Campaign: Research Priorities for Coronavirus Disease 2019 in Critical Illness. **Critical care medicine** vol. 49,4, p.598-622, 2021. doi:10.1097/CCM.0000000000004895

COSTA, A.S. da. **APLICAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS NA BIOTECNOLOGIA.** Centro Universitário de Brasília- UNICEUB; Faculdade de ciências da educação e saúde. Trabalho de Conclusão (Graduação), Brasília, 2019.

CUI, L., *et al.* The nucleocapsid protein of coronaviruses acts as a viral suppressor of RNA silencing in mammalian cells. **Journal of virology**, vol. 89, n17, p. 9029- 9043. 2015. doi:10.1128/JVI.01331-15

CUI, Z., *et al.* Structural and functional characterizations of infectivity and immune evasion of SARS-CoV-2 Omicron. **Cell**; vol. 185,5; p.860-871.e13, 2022. doi:10.1016/j.cell.2022.01.019.

DE ALMEIDA, J. O. *et al.* COVID-19: Fisiopatologia e Alvos para Intervenção Terapêutica. **Revista Virtual de Química.**vol. 12; n.6, 2020.

DECARO, N.; LORUSSO, A. Novel human coronavirus (SARS-Cov-2): a lesson from animal coronaviruses. **Veterinary microbiology**, vol.244, 108693, 2020. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108693

DINAPOLI, J.M. *et al.*, Immunization of Primates with a Newcastle Disease Virus-Vectored Vaccine via the Respiratory Tract Induces a High Titer of Serum Neutralizing Antibodies against Highly Pathogenic Avian Influenza VirusASM Journals. **Journal of Virology.** vol. 81,21; 11560-8, 2007. doi:10.1128/JVI.00713-07

DOMINGO, E. Mechanisms of viral emergence. **Veter. Res.** 41:38, 2010. DOI:10.1051/vetres/2010010

DUTTA, D. *et al.* NLRP3 inflammasome activation and SARS-CoV-2-mediated hyperinflammation, cytokine storm and neurological syndromes. **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology** vol. 14,3 138-160; 2022.

ELFIKY, A.A. Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): A molecular docking study. **Life sciences** vol. 253; 117592, 2020. doi:10.1016/j.lfs.2020.117592

FRAGA-SILVA, T.F.C., *et al.* COVID-19: Integration the complexity of systemic and pulmonar immunopathology to identify Biomarkers for Different Outcomes. **Frontiers in Immunology.** vol.11, n.599736. 2021, doi:10.3389/fimmu.2020.599736

FEHR, A.R., PERLMAN, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. **Methods in molecular biology.** vol. 1282; p.1-23, 2015. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7\_1

GAO, Y., *et al.* Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. **Science** (New York, N.Y.). Vol. 368,6492: p.779-782, 2020. doi:10.1126/science.abb7498

GARCIA-BELTRAN, W.F., *et al.* Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. **Cell.** vol. 184,9; p2372-2383.e9, 2021. doi:10.1016/j.cell.2021.03.013

GENOVESE, L., *et al.* Investigating the mutational landscape of the SARS-CoV-2 Omicron variant via ab initio quantum mechanical modeling. **bioRxiv**, 2021. DOI: 10.1101/2021.12.01.470748.

GRAHAM, M. S. *et al.* Changes in symptomatology, reinfection, and transmissibility associated with the SARS-CoV-2 variant B.1.1.7: an ecological study. **The Lancet. Public health.** vol. 6,5; p335-345, 2021. doi:10.1016/S2468-2667(21)00055-4

GREANEY, A.J., *et al.* Mapping mutations to the SARS-CoV-2 RBD that escape binding by different classes of antibodies. **Nature communications.** vol. 12,1; 4196, 2021, doi:10.1038/s41467-021-24435-8

GRIFFIN, I. *et al.* Zika Virus IgM Detection and Neutralizing Antibody Profiles 12-19 Months after Illness Onset. **Emerging infectious diseases** vol. 25,2: p.299-303, 2019. doi:10.3201/eid2502.181286

GUPTA, RK. Will SARS-CoV-2 variants of concern affect the promise of vaccines? **Nature reviews Immunology.** vol. 21,6; p.340-341, 2021. doi:10.1038/s41577-021-00556-5

HACHMANN, N.P. *et al.* Neutralization escape by SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.2.12.1, BA.4, and BA.5. **The New England journal of medicine.** vol. 387,1: p.86-88, 2022. doi:10.1056/NEJMc2206576

HAMED, M.A. An overview on COVID-19:reality and expectation. **Bulletin of the National Research Centre**.vol. 44, p.1–10, 2020. doi:10.1186/s42269-020-00341-9

HANSEN, J., *et al.* Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. **Science**. vol. 369, p.1010-1014, 2020. doi:10.1126/science.abd0827

HARRISON, A., TAO, L., WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis, **Trends in Immunology**. Vol.41, p.1100-1115, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>

HARVEY, W, *et al.* Variantes de SARS-CoV-2, mutações de pico e fuga imune. **Nature reviews Microbiology**. vol. 19,7, p.409-424, 2021. doi:10.1038/s41579-021-00573-0

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, vol. 181, n.2, p.271-280, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan China. **Lancet**. vol. 395,10223: p.497-506, 2020. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5

HURLBURT, N.K. *et al.* Structural basis for potent neutralization of SARS-CoV-2 and role of antibody affinity maturation. **Nature communications**. vol. 11,1, p.5413, 2020. doi:10.1038/s41467-020-19231-9

HUY, P.Y., *et al.* Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. **The Lancet. Respiratory medicine**. vol. 8,7, p.687-695, 2020. doi:10.1016/S2213-2600(20)30193-4

IKETANI, S., *et al.* Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 omicron sublineages. **Nature**, vol. 604, p.553-556, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04594-4>

INSTITUTO BUTANTAN (Portal Butantan) **Saiba quais são os primeiros sintomas da ômicron e quando eles surgem**. Publicado em: 2022. Disponível em: <https://butantan.gov.br/noticias/saiba-quais-sao-os-primeiros-sintomas-da-omicron-e-quando-eles-surgem>Acesso em: 09.fev.2023

ITO, H., *et al.* NLRP3 inflammasome activation in lung vascular endothelial cells contributes to intestinal ischemia/reperfusion-induced acute lung injury. **Journal of immunology** vol. 205,5; p.1393-1405, 2020. doi:10.4049/jimmunol.2000217

JACKSON, C.B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**. Vol. 23, p.3–20, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>

JIANG, S, HILLYER, C, DU L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. **Trends in immunology** vol. 41,5: p.355-359, 2020. doi:10.1016/j.it.2020.03.007

KENNETH, M., *et al.* **Reconhecimento do Antígeno pelos Receptores de Células B e Células T.** In: KENNETH, M., *et al.* *Imunobiologia de Janeway* [recurso eletrônico] 8ª Edição: Porto Alegre, Artmed, 2014. Pg128-153.

KHAN, K. *et al.* Omicron BA.4/BA.5 escape neutralizing immunity elicited by BA.1 infection. **Nature communications** vol. 13,1; 4686; 2022, doi:10.1038/s41467-022-32396-9

KHATRI, I., STAAL, F.J.T., VAN DONGEN, J.J.M. Blocking of the High-Affinity Interaction-Synapse Between SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Proteins Likely Requires Multiple High-Affinity Antibodies: An Immune Perspective. **Frontiers Immunology**; vol.11; 570018, 2020, doi:10.3389/fimmu.2020.570018

KOENING, PA. *et al.* Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape. **Science**. vol. 371, 6530: eabe6230. 2021 doi:10.1126/science.abe6230

KOTLYAR, AM., *et al.* Vertical transmission of coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. **American journal of obstetrics and gynecology** vol. 224,1, p.35-53.e3. 2021. doi:10.1016/j.ajog.2020.07.049

KREER, C. *et al.* Longitudinal Isolation of Potent Near-Germline SARS-CoV-2-Neutralizing Antibodies from COVID-19 Patients. **Cell** vol. 182 (4), p.843-854.e12. 2020. doi:10.1016/j.cell.2020.06.044

KUMAR, S. *et al.* Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: A comparative computational study of spike protein. **Journal of medical virology** vol. 94,4 (2022): 1641-1649. doi:10.1002/jmv.27526

LASKOWSKI, A.R., *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**. Vol.26 (2), p.283-291, 1993. DOI:10.1107/S0021889892009944

LAUER, SA, *et al.* The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. **Annals of internal medicine** vol. 172,9, p.577-582, 2020 doi:10.7326/M20-0504

LEFRANC, M.P. IMGT, the International ImMunoGeneTics Information System. **Cold Spring Harbor protocols**; vol.6, p.595-603, 2011. doi:10.1101/pdb.top115.

LEFRANC, M.P., *et al.* IMGT(R), the international ImMunoGeneTics information system(R) 25 years on. **Nucleic Acids Res**. Vol.43, D413–22, 2015.

LEONARDO L. G, F., & Andricopulo, A. D. Medicamentos e tratamentos para a Covid-19. **Estudos Avançados**, 34(100), 7-27. 2020. <https://doi.org/10.1590/s0103-4014.2020.34100.002>

LI, F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. **Annual review of virology**, v. 3, p. 237–61, 2016. DOI 10.1146/annurev-virology-110615-042301.

- LI, X., et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of pharmaceutical analysis**. vol. 10,2: p.102-108, 2020. doi:10.1016/j.jpha.2020.03.001
- LI, Q., et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 variants lack higher infectivity but do have immune escape. **Cell**; vol.184, p.2362–2371.e9, 2021. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.042.
- LI, Q., et al. Cross-reactivity of eight SARS-CoV-2 variants rationally predicts immunogenicity clustering in sarbecoviruses. **Sig Transduct Target Ther**. Vol.7; 256; 2022 <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01123-7>.
- LIU, L., et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. **Nature**. vol.584,7821: p.450-456; 2020. doi:10.1038/s41586-020-2571-7
- LIU J., et al. Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. **Journal of Medical Virology**. Vol.92(5), p.491-494, 2020. doi:10.1002/jmv.25709
- LIU, L., et al. Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. **Nature**, vol.602, p.676–681. 2022. doi: 10.1038/s41586-021-04388-0.
- LONG, QX., et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. **Nat. Med.**, vol.26, p. 845-848, 2020.Doi: 10.1038/s41591-020-0897-1
- LURIE N., et al. Developing Covid-19 Vaccines at Pandemic Speed. **N Engl J Med**. Vol.382 (21), p.1969-73, 2020. doi:10.1056/NEJMp2005630
- MAHASE, E. Delta variant: What is happening with transmission, hospital admissions, and restrictions? **The BMJ**, vol.373, n1513-; 2021. doi: 10.1136/bmj.n1513
- MAROVICH, M., MASCOLA, J.R., COHEN, M.S. Monoclonal Antibodies for Prevention and Treatment of COVID-19. **JAMA**. 324(2):131–132; 2020. doi:10.1001/jama.2020.10245
- MARSTON, H.D., PAULES, C.I., FAUCI, A.S. Monoclonal antibodies for emerging infectious diseases—borrowing from history. **N Engl J Med**. Vol. 378(16): p.1469-1472. 2018. DOI: 10.1056/NEJMp1802256
- MASTERS, P.S. The Molecular Biology of Coronaviruses, **Advances in Virus Research, Academic Press**, Vol. 66, P.193-292. 2006. doi:10.1016/S0065-3527(06)66005-3
- MATSUYAMA, S. et al. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. Proceedings of the National Academy of Sciences, **National Acad Sciences**, v.102, n.35, p.12543–12547, 2005. doi:10.1073/pnas.0503203102
- MICHELON, CM. Principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil. **RBAC**. Vol.53(2), p.109-116. 2021.

MIZUMOTO, K. *et al.* Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. **Euro Surveill.** Vol.25(10) 2020. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000180

MOSER, M.; LEO, O. Key Concepts in Immunology. **Vaccine** vol. 28 Suppl 3: C2-13. 2010. doi:10.1016/j.vaccine.2010.07.022

NAL, B., *et al.* Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. **Journal of General Virology**, vol. 86, Issue 5, 2005. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80671-0>

NARAYANAN, K. *et al.* Nucleocapsid-independent specific viral RNA packaging via viral envelope protein and viral RNS signal. **Journal of Virology**, vol. 77, p. 2922-2927, 2003. doi:10.1128/jvi.77.5.2922-2927.2003

OU, X. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of sars-cov-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with sars-cov. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p.1–12, 2020. DOI 10.1038/s41467-020-15562-9.

PEREIRA, A, DA CRUZ, K.A.T, LIMA P.S. PRINCIPAIS ASPECTOS DO NOVO CORONAVÍRUS SARS-CoV-2: UMA AMPLA REVISÃO. **ARQUIVOSDOMUDI** [Internet]. vol. 25(1), p.73-0, 2021. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/55455>.

PETTERSEN, E.F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem.** vol25(13), p.1605-12; 2004. doi: 10.1002/jcc.20084.

PETTERSEN, E.F. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, vol.30, p.70–82, 2021. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>

PINTO, D., *et al.* Structural and functional analysis of a potent sarbecovirus neutralizing antibody. **bioRxiv: the preprint server for biology** 2020, doi:10.1101/2020.04.07.023903. Preprint.

PLANAS, D., *et al.* Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. **Nature**, vol.602, p.671–675, 2022. doi: 10.1038/s41586-021-04389-z.

PLOTKIN, S.A. Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. **Clin. Infect. Dis.**, vol.47, p.401-409, 2008. DOI:10.1086/589862.

PLOTKIN, S.A. Correlates of protection induced by vaccination. **Clin. Vaccine Immunol.**, vol.17, p.1055-1065, 2010. DOI:10.1128/CVI.00131-10.

PREMKUMAR, L., *et al.* The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. **Science immunology** vol.5,48: eabc8413. 2020. doi:10.1126/sciimmunol.abc8413

PROMPETCHARA, E.; KETLOY, C.; PALAGA, T. Immune Responses in COVID-19 and Potential Vaccines: Lessons Learned from SARS and MERS Epidemic. **Asian Pacific journal of allergy and immunology.** vol. 38,1, p.1-9, 2020. doi:10.12932/AP-200220-0772

QI, F., *et al.* Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Vol.526, p.135–140, 2020. [10.1016/j.bbrc.2020.03.044](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.044)

QU, P. *et al.* Neutralization of the SARS-CoV-2 Omicron BA.4/5 and BA.2.12.1 Subvariants. **N. Engl. J. Med.** Vol.386, p.2526–2528, 2022. [doi:10.1056/NEJMc2206725](https://doi.org/10.1056/NEJMc2206725)

QU, P., *et al.* Enhanced neutralization resistance of SARS-CoV-2 Omicron subvariants BQ.1, BQ.1.1, BA.4.6, BF.7, and BA.2.75.2, **Cell Host & Microbe**, Vol.31, Issue1, p.9-17.E3, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.11.012>.

RABI, F.A. *et al.* SARS-CoV-2 and coronavirus disease 2019: what we know so far. **Pathogens**, vol. 9, p.231, 2020. [doi:10.3390/pathogens9030231](https://doi.org/10.3390/pathogens9030231)

RAMANATHAN, K., *et al.* Type I and Type III Interferons – Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. **Cell host & microbe** vol. 27,6, p.870-878, 2020. [doi:10.1016/j.chom.2020.05.008](https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008)

RAMBAUT, A., *et al.* A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature microbiology**. vol.5,11; p.1403-1407; 2020. [doi:10.1038/s41564-020-0770-5](https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5)

RANGEL, M.A., *et al.* Fragment-based computational design of antibodies targeting structured epitopes. **Sci. Adv.** Vol.8, 45, 2022. DOI: [10.1126/sciadv.abp954](https://doi.org/10.1126/sciadv.abp954)

RATH, S.L.; PAPHI, A.K.; MANDAL, N. Scanning the RBD-ACE2 molecular interactions in Omicron variant. **Biochem Biophys Res Commun.** Vol.592, p.18-23, 2022. [doi:10.1016/j.bbrc.2022.01.006](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.01.006)

ROBBIANI, D.F. *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. **Nature** Vol.584, p.437–442, 2020. [doi:10.1038/s41586-020-2456-9](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2456-9)

ROGERS, T.F. *et al.* Rapid isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection in a small animal model. **bioRxiv** : the preprint server for biology 2020.05.11.088674, 2020. [doi:10.1101/2020.05.11.088674](https://doi.org/10.1101/2020.05.11.088674). Preprint.

ROMANOS, M. T. V.; SANTOS, N. S. de O.; WIGG, M. D.; *Virologia Humana*, 3a ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2015.

SERPA, F.S., *et al.* Vacinas COVID-19 e imunobiológicos COVID. **Arq Asma Alerg Imunol.** Vol. 5, N° 2, 2021. <http://dx.doi.org/10.5935/2526-5393.20210022>

SEYDOUX, E., *et al.* Analysis of a SARS-CoV-2 infected individual reveals development of potent neutralizing antibodies to distinct epitopes with limited somatic mutation. **Immunity**, vol.53:1, p.98–105, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.001>

SHAHHOSSEINI, N. *et al.* Mutation Signatures and In Silico Docking of Novel SARS-CoV-2 Variants of Concern. **Microorganisms**, vol.9, 926; 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050926>

SHEREEN, M.A. et al. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **Journal of advanced research**. Vol. 24, p.91-98. 2020. doi:10.1016/j.jare.2020.03.005

SHI, R., *et al.* A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. **Nature** vol.584, p.120–124, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2381-y>

SIEVERS, F., *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol. Syst. Biol.** Vol.7; 539; 2011 DOI: 10.1038/msb.2011.75

SILVA, A.L.L.; DE SÁ, L.R. VACINAS CONTRA A SARS-COV-2: MECANISMO DE AÇÃO E COBERTURA CONTRA POSSÍVEIS MUTAÇÕES. **REVISTA TRANSFORMAR** vol.15(2), 2021. <http://fsj.edu.br/transformar/index.php/transformar/article/view/648>

SIU, Y. L. *et al.* The M, E and N structural proteins of the Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus are required for eficiente assembly, trafficking, and release of vírus-like particles, **Journal of Virology**, vol. 82,22; p.11318-30. 2008. doi:10.1128/JVI.01052-08

SLUPETZKY, K., *et al.* A papillomavirus-like particle (VLP) vaccine displaying HPV16 L2 epitopes induces cross-neutralizing antibodies to HPV11, **Vaccine**, Vol. 25, Issue 11, p.2001-2010, 2007. doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.049.

SMITH, E.C, *et al.* Os coronavírus sem atividade de exoribonuclease são suscetíveis à mutagênese letal: evidências para revisão e terapêutica potencial. **Pato PLoS**. Vol.9:e1003565. 2013. doi: 10.1371/journal.ppat.1003565

SONG, W, *et al.* Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. **PLoS Pathog**. Vol.14(8):e1007236; 2018. doi:10.1371/journal.ppat.1007236

SITTHIYOTHA T., CHUNSRIVIROT, S. Computational design of SARS-CoV-2 peptide binders with better predicted binding affinities than human ACE2 receptor. **Sci Rep**. Vol.11, 15650, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94873-3>

STRABELLI, T.M.V; UIP, D.E. COVID-19 e o Coração. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.114, p.598-600, 2020. DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20200209>

SUTHAR, M.S., *et al.* Rapid generation of neutralizing antibody responses in COVID-19 patients. **Cell Reports Med**, vol.1 p. 100040, 2020. DOI:10.1016/j.xcrm.2020.100040

SWANSON, K.V., DENG, M., TING, J.P. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nat. Rev. Immunol.** Vol.19, p.477–489; 2019. doi:10.1038/s41577-019-0165-0

TAN, WJ, ZHAO, X, MA XJ. A novel coronavirus genome identified in a cluster of pneumonia cases: Wuhan, China 2019-2020. **China CDC Weekly**. Vol.2, p.61-2. 2020.doi: 10.1056/NEJMoa2001017

TANG, X.C., *et al.* Identificação de anticorpos neutralizantes humanos contra MERS-CoV e seu papel na evolução adaptativa do vírus. **Proc Natl Acad Sci EUA**. vol111(19):E2018-2026. 2014. doi:10.1073/pnas.1402074111

TAO, K., *et al.* The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. **Nat Rev Genet**. Vol.22, p.757–73. 2021. doi: 10.1038/s41576-021-00408-x

TAY, M.Z., *et al.* The trinity of COVID19: immunity, inflammation and intervention. **Nat. Rev. Immunol**. Vol.20, p.363–374; 2020. doi:10.1038/s41577-020-0311-8

TAYLOR, P.C., *et al.* Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. **Nat Rev Immunol**; 21, 382–393, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00542-x>

TEGALLY, H., *et al.* Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. **Nature**. Vol.592,7854, p.438-443, 2021.doi:10.1038/s41586-021-03402-9

TEGALLY, H. *et al.* Emergence of SARS-CoV-2 Omicron lineages BA.4 and BA.5 in South Africa. **Nat. Med.** Vol.28, p.1785–1790, 2022. doi:10.1038/s41591-022-01911-2

TEUWEN, LA. *et al.* COVID-19: the vasculature unleashed. **Nat Rev Immunol**. Vol.20(7), p.389-391, 2020. doi:10.1038/s41577-020-0343-0

THOMPSON, E.C., *et al.* Circulating SARS-CoV-2 spike N439K variants maintain fitness while evading antibody-mediated immunity. **Cell**, 184 (2021), pp. 1171-1187.e20, 10.1016/j.cell.2021.01.037

TILLER, K. E.; TESSIER, P. M. Advances in Antibody Design. **Annual Review of Biomedical Engineering**. Vol.17, p. 191-216, 2015. doi:10.1146/annurev-bioeng-071114-040733

TORTORICI, M.A., *et al.* Ultrapotent human antibodies protect against SARS-CoV-2 challenge via multiple mechanisms. **Science**, vol.80 (3354), p.29-31, 2020. 10.1029/2002GC000367

TREEWATTANAWONG, SITTHIYOTHA T., CHUNSRIVIROT, S. Computational redesign of Fab CC12.3 with substantially better predicted binding affinity to SARS-CoV-2 than human ACE2 receptor. **Sci Rep**. Vol.11, 22202, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00684-x>

VAN DE VEERDONK, FL, *et al.* Kallikrein-kinin blockade in patients with COVID-19 to prevent acute respiratory distress syndrome. **Elife**. Vol.27;9; 2020. doi:10.7554/eLife.57555

VERAS, F. P., *et al.* SARS-CoV-2–triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. **Journal of Experimental Medicine**, vol.217(12); 2020. doi:10.1084/jem.20201129

VILELA FILHO, A de Sá, *et al.* Vacinas para Covid-19: Uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.8, n.1, p.1880-1901; 2022. <http://app.uff.br/riuff/handle/1/26772>

VOLZ, E., *et al.* Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. **Nature** vol. 593,7858: p.266-269, 2021. doi:10.1038/s41586-021-03470-x

VORA, S.M., LIEBERMAN, L., WU, H. Inflammasome activation at the crux of severe COVID-19. **Nat Rev Immunol.** vol.21, p.694–703, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00588-x>

WANG, S. *et al.* Endocytosis of the receptor-binding domain of sars-cov spike protein together with virus receptor ace2. *Virus research*, **Elsevier**, v.136, n.1-2, p.8–15, 2008. DOI 10.1016/j.virusres.2008.03.004.

WANG, P., *et al.* Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. **Nature** vol.593, p.130–135, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>

WANG, Q. *et al.* Antibody evasion by SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.2.12.1, BA.4 and BA.5. **Nature.** Vol.608, p.603–608, 2022. doi:10.1038/s41586-022-05053-w

WARD, R. Mechanisms of Protection Against Rotavirus Infection and Disease. **The Pediatric Infectious Disease Journal** vol.28(3), p.S57-S59, 2009. DOI: 10.1097/INF.0b013e3181967c16

WARD, P. *et al.* ‘COVID-19/SARS-CoV-2 Pandemic’, Faculty of Pharmaceutical Medicine blog, 6 April. Available at: <https://www.fpm.org.uk/blog/covid-19-sars-cov-2-pandemic/>. (Acesso em:15.01.23).

WALLS, A.C. *et al.* “Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer.” **Nature** vol. 531,7592, p.114-117, 2016. doi:10.1038/nature16988

WHAN, W.J., *et al.* Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. **European Respiratory Journal**; vol55,5; 2000547; 2020. doi:10.1183/13993003.00547-2020

WHITAKER, M., *et al.* Variant-specific symptoms of COVID-19 in a study of 1,542,510 adults in England. **Nat Commun.** vol13, 6856; 2022. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34244-2>

WHO [World Health Organization]. Recebendo a vacina COVID-19.(2021) Disponível em :<https://www.who.int/pt/news-room/feature-stories/detail/getting-the-covid-19-vaccine>. (Acesso em: 20.out.2022)

(A)WHO [World Health Organization]. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. OVERVIEW: Cases, Deaths and Vaccines. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. (Acesso em: 09.fev.23)

(B)WHO [World Health Organization]. Tracking SARS-CoV-2 variants. Disponível in: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>, 2022 (Acesso em: 06. Jan. 2023).

WIERSINFA, W.J., *et al.* Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of Coronavirus Disease (COVID-19). **Journal of the American Medical Association; JAMA** vol. 324,8, 7p.82-793; 2020. doi:10.1001/jama.2020.12839

WILLIAMS, C.J., *et al.* MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**. vol. 27,1; p.293-315. 2018. doi:10.1002/pro.333

WONG, J.P; DAMANIA, B. “SARS-CoV-2 dependence on host pathways.” **Science**. vol. 371,6532 p.884-885, 2021. doi:10.1126/science.abg6837

WRAPP, D., *et al.* “Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.” **Science**, vol.367,6483, p.1260-1263, 2020. doi:10.1126/science.abb2507

WU, K.P., *et al.* Structural Basis of a Flavivirus Recognized by Its Neutralizing Antibody. **The Journal of biological chemistry**. vol. 278,46; p.46007-13. 2003.doi:10.1074/jbc.M307776200

WU, J., *et al.* Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury. **J. Immunol.** Vol.190, p.3590–3599; 2013. [https://doi.org/10.1096/fasebj.27.1\\_supplement.684.2](https://doi.org/10.1096/fasebj.27.1_supplement.684.2)

WU, F.; *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 2020. doi:10.1038/s41586-020-2008-3

WU, N.C., *et al.* An Alternative Binding Mode of IGHV3-53 Antibodies to the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain. **Cell Rep.** Vol. 33(3), 108274, 2020. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108274

WU, Y., *et al.* A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2. **SCIENCE** vol.368, p.1274-1278. 2020. DOI: 10.1126/science.abc2241

YEO, C, KAUSHAL, S, YEO D. Enteric involvement of coronaviruses: is faecal-oral transmission of SARS-CoV-2 possible? **Lancet Gastroenterol Hepatol.** vol5(4), p.335-337. 2020. doi:10.1016/S2468-1253(20)30048-0

YAMAMOTO, V. *et al.* “COVID-19: Review of a 21st Century Pandemic from Etiology to Neuro-psychiatric Implications.” **Journal of Alzheimer's disease : JAD** vol. 77,2, p.459-504; 2020. doi:10.3233/JAD-200831

YANG, Y; DU, L. SARS-CoV-2 spike protein: a key target for eliciting persistent neutralizing antibodies. **Sig Transduct Target Ther.** Vol.6; 95. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00523-5>

YANG, N; SHEN, H. Targeting the Endocytic Pathway and Autophagy Process as a Novel Therapeutic Strategy in COVID-19. **International journal of biological sciences.** Vol. 16,10. p.1724-1731. 2020. doi:10.7150/ijbs.45498

YUAN, Y. *et al.* Cryo-em structures of mers-cov and sars-cov spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p.1–9, 2017. DOI 10.1038/ncomms15092.

YUAN, M., *et al.* Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2. **Science** vol.369,6507; p.1119-1123, 2020a. doi:10.1126/science.abd2321

YUAN, M. *et al.* A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. **Science**, v. 368, n.6491, p. 630–633, 2020b. DOI: 10.1126/science.abb7269

ZAHRADNÍK, J. *et al.* SARS-CoV-2 variant prediction and antiviral drug design are enabled by RBD in vitro evolution. **Nat Microbiol.** Vol.6, p.1188–1198, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00954-4>

ZHANG, L., *et al.* “The significant immune escape of pseudotyped SARS-CoV-2 variant Omicron.” **Emerging microbes & infections.** vol.11,1, p.1-5. 2022. doi:10.1080/22221751.2021.2017757

ZHAO, J., *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. **Clin. Infect. Dis.** vol.71,16, p.2027-2034; 2020. doi:10.1093/cid/ciaa344

ZHOU W, WANG W. Variantes SARS-COV-2 de rápida expansão: desafios e novas estratégias de design de vacinas COVID-19. **Nature.** (2021) 6:226. doi: 10.1038/s41392-021-00644-x

ZHOU, Y., ZHI, H., TENG, Y. The outbreak of SARS-CoV-2 Omicron lineages, immune escape, and vaccine effectivity. **J Med Virol.** vol. 95,1; e28138. 2023. <https://doi.org/10.1002/jmv.28138>

ZOST, S.J., *et al.* Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. **Nature.** vol.584, p.443–449, 2020. doi:10.1038/s41586-020-2548-6

ZUMLA, A, *et al.* Reducing mortality from 2019- nCoV: host-directed therapies should be an option. **Lancet.** Vol.395 (10224):e35–6; 2020. doi:10.1016/S0140-6736(20)30305-6