

ANÁLISE IN SÍLICO DE PROTEÍNAS DE ENVELOPE DE *ORTHOBUNYAVIRUS*

¹ANA CAMILENA DOS SANTOS, ²CAMILA FRANCO BATISTA DE OLIVEIRA,
²TARCISIO JOSÉ DOMINGOS COUTINHO

¹Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE),

²Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB)

<ana.camilena.santos07@aluno.ifce.edu.br> <camilafrancobo@gmail.com>

<tarcisio.coutinho@ifpb.edu.br>

DOI: 10.21439/conexoes.v19.3852

Resumo. O gênero *Orthobunyavirus* está entre os grupos de arbovírus mais amplamente distribuídos pelo planeta e possui importantes patógenos de vertebrados, incluindo humanos. As proteínas de envelope Gn-Gc formam um dímero que é o responsável pela fusão das membranas e entrada do vírus na célula hospedeira. O presente trabalho tem por objetivo comparar, proteínas de envelope de *orthobunyavirus* através de ferramentas de bioinformática. Para isso foram obtidas, a partir de bancos de dados públicos, sequências proteicas e submetidas aos softwares *ClustalO*, *Pepstats*, *Predator* e *VaxiJen* a fim de verificar o percentual de identidade, propriedades físico-químicas dos resíduos, estrutura secundária e propriedades antigênicas das proteínas. Quanto aos resultados foi observado que as proteínas Gn, de maneira geral, são mais conservadas quando comparadas com Gc. Gn apresenta, percentualmente, mais resíduos apolares que Gc e ambas apresentam predominância de folhas beta em suas estruturas secundárias e podem atuar como moléculas antigênicas, mostrando que quanto a estas características são bastante similares. É importante que novas análises sejam realizadas não apenas para melhorar a compreensão sobre essas moléculas, mas como as mesmas podem ser utilizadas para desenvolver terapias de combate aos vírus.

Palavras-chave: *orthobunyavirus*; proteínas de envelope; caracterização físico-química; bioinformática.

IN SILICO ANALYSIS OF *ORTHOBUNYAVIRUS* ENVELOPE PROTEINS

Abstract. The *Orthobunyavirus* genus ranks among the most widely distributed groups of arboviruses worldwide, harboring significant vertebrate pathogens, including humans. The envelope proteins Gn-Gc form a dimer crucial for membrane fusion and virus entry into the host cell. This study aims to compare *orthobunyavirus* envelope proteins using bioinformatics tools. To this end, protein sequences were obtained from public databases and subjected to the *ClustalO*, *Pepstats*, *Predator* and *VaxiJen* software to assess identity percentage, physicochemical properties of residues, secondary structure, and antigenic properties of the proteins. Regarding the results, it was observed that Gn proteins are generally more conserved compared to Gc. Gn exhibits a higher percentage of nonpolar residues than Gc, and both display a predominance of beta sheets in their secondary structures and may act as antigenic molecules, indicating considerable similarity in these characteristics. It is crucial for further analyses to be conducted not only to enhance understanding of these molecules but also to explore their potential for developing antiviral therapies.

Keywords: *orthobunyavirus*; envelope proteins; physicochemical characterization; bioinformatics.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Orthobunyavirus* está entre os grupos de arbovírus mais amplamente distribuídos pelo planeta e possui importantes patógenos de vertebrados, incluindo humanos, que são transmitidos por uma variedade de artrópodes vetores, tais como mosquitos culicídeos, carrapatos e flebotomíneos (Foster; al., 2023).

A entrada de vírus envelopados, como os *orthobunyavirus*, nas células hospedeiras está intimamente relacionada com a fusão das membranas, que é um processo complexo e mediado por proteínas presentes no envelope viral. De maneira geral, as proteínas de fusão sofrem alterações conformacionais a partir da interação com os receptores presentes na membrana plasmática celular, que resultam normalmente na exposição de regiões como as alças hidrofóbicas que promovem a mistura entre os lipídios virais e celulares (Leal; Carvalho, 2023).

O genoma dos *orthobunyavirus* é formado por três segmentos de RNA fita simples de sentido negativo com diferentes tamanhos, ou seja, existe um grande (L de *large* do inglês), um médio (M de *medium* do inglês) e um pequeno (S de *small* do inglês) (Peinado *et al.*, 2022). O segmento M codifica, a partir de uma poliproteína precursora, as glicoproteínas do envelope viral Gn e Gc, que são unidas no lúmen do retículo endoplasmático das células hospedeiras, de forma que o heterodímero formado é transportado para o complexo golgiense de onde brotam os novos *vírions* (Hellert; al., 2019).

No Brasil já foram identificados pelo menos 57 *orthobunyavirus*, sendo que dentre estes pelo menos 13 foram isolados em humanos e são responsáveis por causar diversas enfermidades, com destaque para doenças febris que podem avançar para hepatites, meningites e em circunstâncias mais graves podem levar a morte (Dias; Santos; Pauvolid-Corrêa, 2022).

O vírus *Oropouche* (*Orthobunyavirus oropoucheense* - *OROV*), um *orthobunyavirus*, é um dos arbovírus que mais infectam humanos no Brasil, pois há uma estimativa que mais de meio milhão de brasileiros já foram infectados, no entanto é provável que este número seja subestimado pelo fato da febre causada por esse vírus ser muitas vezes confundida com outras doenças, tais como dengue, *chikungunya*, *zika* e *febre mayaro* (Travassos da Rosa *et al.*, 2017).

Segundo a OPAS, o Estado do Amazonas, no Norte do Brasil, emitiu um alerta epidemiológico sobre os casos notificados no estado do vírus *Oropouche*. Entre 2023 e janeiro de 2024 foram detectados 1.066 casos em humanos, sendo que este número pode ser muito maior, devido à subnotificação desta doença (OPAS/OMS, 2024).

Fatores ambientais como desmatamento e mudanças climáticas, alteram os habitats de organismos vetores e reservatórios e colaboram com a disseminação viral causando novos e mais frequentes surtos de *orthobunyavirus*, como o registrado recentemente na região norte do Brasil (Moreira, 2024).

Portanto é fundamental que estudos sobre arbovírus emergentes, como os *orthobunyavirus*, e suas interações com o ambiente sejam tratados como prioridade para as autoridades de saúde pública do Brasil, bem como o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos específicos para que haja prevenção e correta identificação deste vírus melhorando assim a qualidade de vida da população, especialmente, da presente em áreas endêmicas (Pereira *et al.*, 2021).

Dessa forma o presente trabalho tem por objetivo explorar, do ponto de vista comparativo, proteínas de envelope de *orthobunyavirus* através de ferramentas de bioinformática afim de para determinar suas identidades de sequência, estimar as propriedades de seus resíduos, prever suas estruturas secundárias e reconhecer seus potenciais antígenicos.

2 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Sequências proteicas

As sequências das proteínas de envelope virais utilizadas foram obtidas a partir do banco de dados *nucleotide* contido no *site* do NCBI (*National Center for Biotechnologic Information*) — <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> — acessadas em 22/03/2024, no formato FASTA (Sayer; al., 2022), como sequências completas de aminoácidos derivadas por tradução conceitual de regiões codificantes anotadas no genoma de referência.

2.2 Alinhamento múltiplo

As sequências de aminoácidos das proteínas de envelope foram alinhadas utilizando o *ClustalO web server* — <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> — acessado em 27/03/2024 (Sievers; al., 2011).

2.3 Estimativa de Propriedades dos Resíduos de Aminoácidos

As propriedades dos resíduos de aminoácidos de cada sequência foram estimadas a partir da submissão das mesmas ao *web server* Pepstats — https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/ — acessado em 27/03/2024 (Rice; Longden; Bleasby, 2000).

2.4 Predição de Estruturas Secundárias

Para obtenção das estruturas secundárias, as proteínas foram submetidas ao *web server* Predator — https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_predator.html — acessado em 27/03/2024 (Combet; al., 2000).

2.5 Predição de Propriedade Antigênica

Para saber se as proteínas analisadas apresentavam características imunogênicas atuando como antígenos, as mesmas foram submetidas ao *web server* VaxiJen — <https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html> — acessado em 27/03/2024 (Doytchinova; Flower, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os arbovírus são um problema de saúde pública em diversas partes do mundo, muito por conta de seu potencial de dispersão, adaptação a novos ambientes e hospedeiros, assim como pela possibilidade de causar epidemias duradouras com ocorrência de casos graves, com sintomas que podem ir de febre a problemas neurológicos, passando por lesões articulares e hemorragias graves (Donalisio; Freitas; Zuben, 2017).

Dentre os 13 tipos de *Orthobunyavirus* isolados em brasileiros (Dias; Santos; Pauvolid-Corrêa, 2022) foram encontrados 8 genomas completos de referência (Tabela 1), e, conseqüentemente, 16 proteínas de envelope distribuídas igualmente entre Gn e Gc, que foram as utilizadas nas análises realizadas neste trabalho.

Uma informação importante a ser considerada neste ponto é que o identificador utilizado para cada proteína de um vírus é o mesmo, pois a anotação está relacionada com a poliproteína precursora e não com as proteínas individuais codificadas pelo segmento genômico, como pode ser observado na Tabela 1.

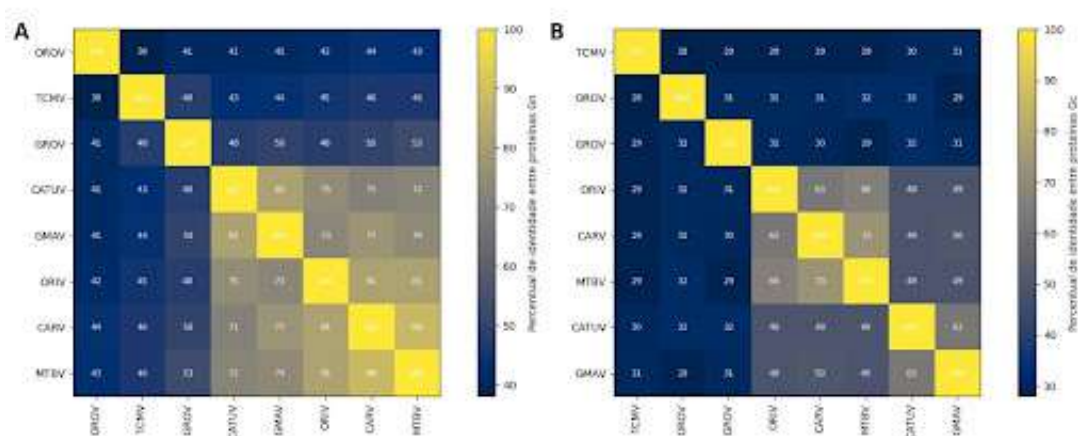
Tabela 1: Lista dos *Orthobunyavirus* e identificadores da poliproteína codificada pelo segmento M de cada vírus.

Orthobunyavirus	Abreviação	Identificador
<i>Orthobunyavirus tacaïmaense</i>	TCMV	YP_009667046.1
<i>Orthobunyavirus guaroense</i>	GROV	YP_009362080.1
<i>Orthobunyavirus caraparuense</i>	CARV	YP_009362046.1
<i>Orthobunyavirus maritubaense</i>	MTBV	YP_009362078.1
<i>Orthobunyavirus oribocaense</i>	ORIV	YP_009362062.1
<i>Orthobunyavirus catuense</i>	CATUV	YP_009507869.1
<i>Orthobunyavirus guamaense</i>	GMAV	YP_009507878.1
<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	OROV	NP_982303.1

Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

O alinhamento realizado entre as proteínas Gn dos diferentes *Orthobunyavirus* revelou que há maior identidade entre CARV e MTBV (88%), ORIV e CARV (81%), CATUV e GMAV (81%), GMAV e CARV (77%), enquanto que para Gc o maior percentual de identidade foi observado entre os vírus CARV e MTBV (73%), ORIV e MTBV (66%), ORIV e ORIV (63%). Outro aspecto observado a respeito da identidade é que, de forma geral, as proteínas Gn variam de 38% a 88%, enquanto que Gc variam de 28% a 73%, o que parece indicar que as proteínas Gc são mais variáveis entre si do que as Gn, que parecem ser mais conservadas (Figura 1).

As estruturas dos complexos formados pelas proteínas Gn-Gc de diversos *Orthobunyavirus* relacionados sugerem que Gn atue como uma subunidade que protege as alças de fusão e que atue na mediação do contato inicial com a célula hospedeira (Hover; al., 2023), o que pode explicar um maior percentual de identidade entre os diferentes *Orthobunyavirus* analisados, uma vez que, como atuam protegendo uma importante região proteica e possuem papel importante na interação com a célula, variar a composição de seus aminoácidos pode comprometer suas funções e a replicação viral.

Figura 1: Matriz de identidade de sequência das proteínas Gn (A) e Gc (B).

Legenda: Percentual de identidade é expresso através de gradiente de cor dos valores mínimos (azul escuro) aos máximos (amarelo).

Em *Orthobunyavirus*, a proteína Gc consiste de uma proteína de fusão classe II, ou seja, é a responsável direta pela entrada do vírus na célula do hospedeiro, sendo a extremidade N-terminal mais variável e com pouca participação no processo de fusão, enquanto a C-terminal é mais conservada e diretamente relacionada com a entrada na célula (Guardado-Calvo; Rey, 2021).

Um estudo recente demonstra que a proteína Gc de *Orthobunyavirus oropoucheense* isolados em países da América do Sul apresenta diversos sítios que estão sob seleção positiva (Gutierrez; al., 2020), ou seja, substituições de aminoácidos podem ser selecionadas, o que diminui a identidade entre as mesmas e, da mesma forma que acontece entre diferentes isolados do mesmo tipo de vírus, isto pode também estar ocorrendo entre as proteínas dos diversos *Orthobunyavirus* analisados.

Quanto às propriedades físico-químicas dos resíduos de aminoácidos que formam as proteínas de envelope, foi observado que, de maneira geral, as proteínas Gn tendem a ter um percentual maior de aminoácidos apolares em sua composição, enquanto que, para as proteínas Gc, percebe-se que há uma tendência a equilíbrio entre os percentuais de aminoácidos polares e apolares em suas sequências, conforme pode ser observado na Figura 2.

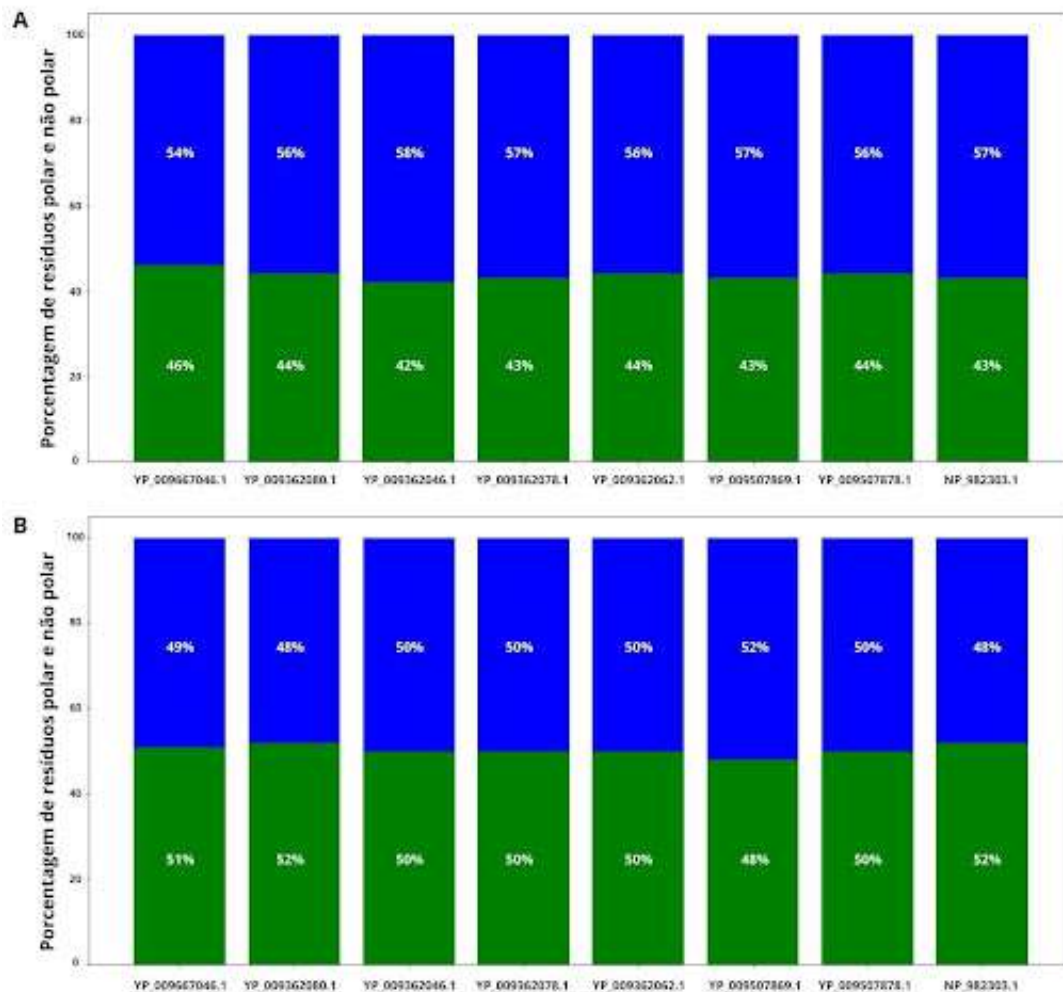
Dentre os resíduos carregados, percebe-se que, percentualmente, independente da proteína, os não carregados são os que apresentam maior percentual, seguidos pelos carregados positivamente e, por último, estão os carregados negativamente, conforme pode ser observado na Figura 3.

Este considerável percentual de resíduos apolares nas proteínas Gn e Gc pode ser justificado pelo fato de as mesmas possuírem regiões que estão mergulhadas na bicamada de lipídios que formam o envelope viral (White; al., 2023), de forma que parece que a distribuição dos resíduos polares e apolares obedece a um certo padrão nas proteínas destes vírus, uma vez que a variação, quando há a comparação apenas entre Gn ou Gc, é baixa do ponto de vista percentual.

Quanto à análise das estruturas secundárias, as proteínas Gn e Gc apresentaram um padrão similar, pois em ambas há uma prevalência de regiões de folha beta em relação às de alfa hélice. Analisando apenas a proteína Gn, percebe-se que, para a maioria dos vírus, as estruturas de alfa hélice estão mais presentes a partir do resíduo 130 (aproximadamente) em direção ao C-terminal, já para Gc estas estruturas secundárias estão mais relacionadas com o N-terminal (Figura 4).

No que diz respeito às proteínas de fusão, no caso Gc, é esperado que haja um predomínio da estrutura secundária de folha beta, pois é uma característica das proteínas que desempenha essa função (Lozada; al., 2021), no entanto o que chama a atenção é que fenômeno similar, do ponto de vista estrutural, ocorre com Gn que não desempenha tal função.

Analisando a capacidade destas proteínas serem reconhecidas pelo sistema imune humano como antígenos, verificou-se que tanto Gn quanto Gc podem atuar como tal, pois seus valores de antigenicidade, independente do vírus, estão acima do ponto de corte definido pelo *software*, que é 0,4, conforme pode ser observado na Tabela 2.

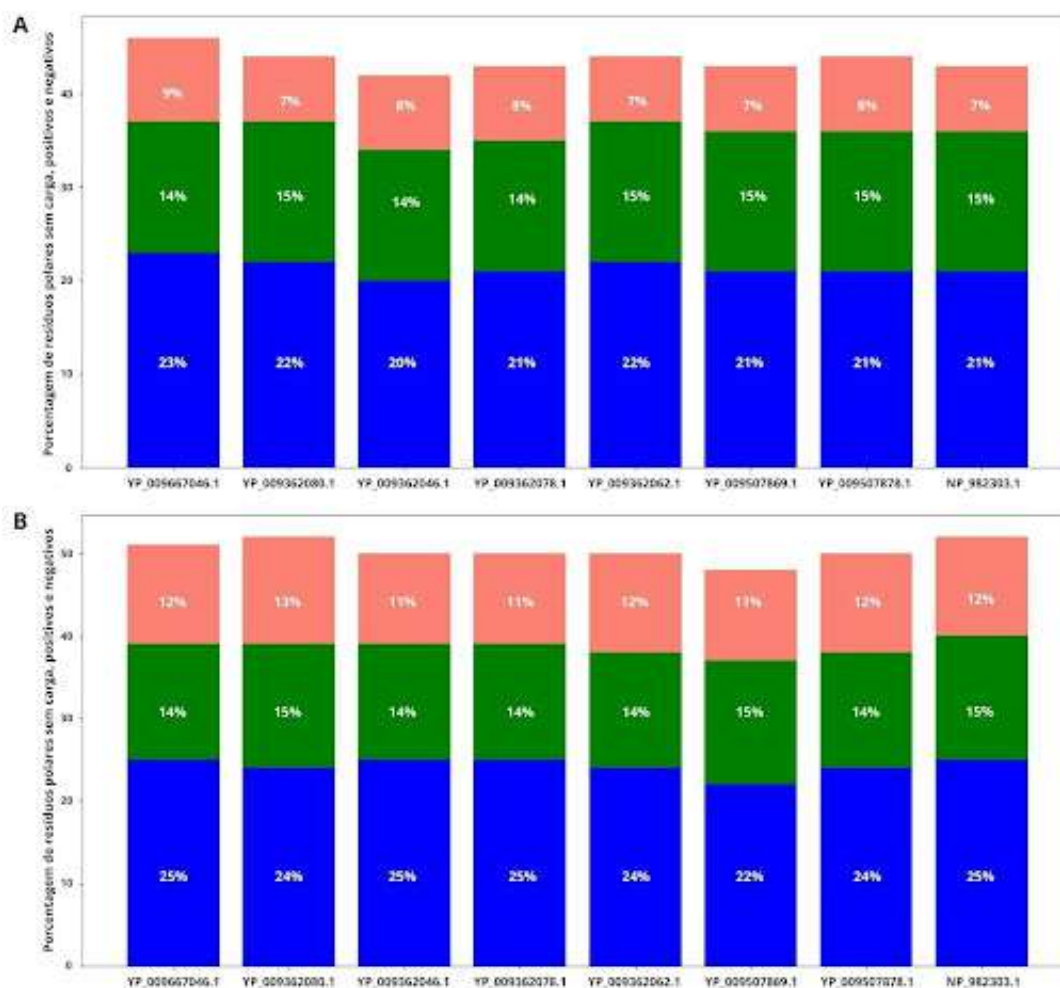
Figura 2: Propriedades físico-químicas das proteínas Gn (A) e Gc (B).

Legenda: Verde - resíduos polares (D, E, H, K, N, Q, R, S e T) e azul - resíduos apolares (A, C, F, G, I, L, M, P, V, W e Y).

Tabela 2: Valores de antigenicidade das proteínas Gn e Gc.

Identificador	Antigenicidade	
	Gn	Gc
YP_009667046.1	0,4289	0,5926
YP_009362080.1	0,6529	0,5305
YP_009362046.1	0,5413	0,4797
YP_009362078.1	0,5065	0,4852
YP_009362062.1	0,5162	0,5763
YP_009507869.1	0,5885	0,5540
YP_009507878.1	0,5588	0,5415
NP_982303.1	0,4106	0,5567

Fonte: Dados do experimento.

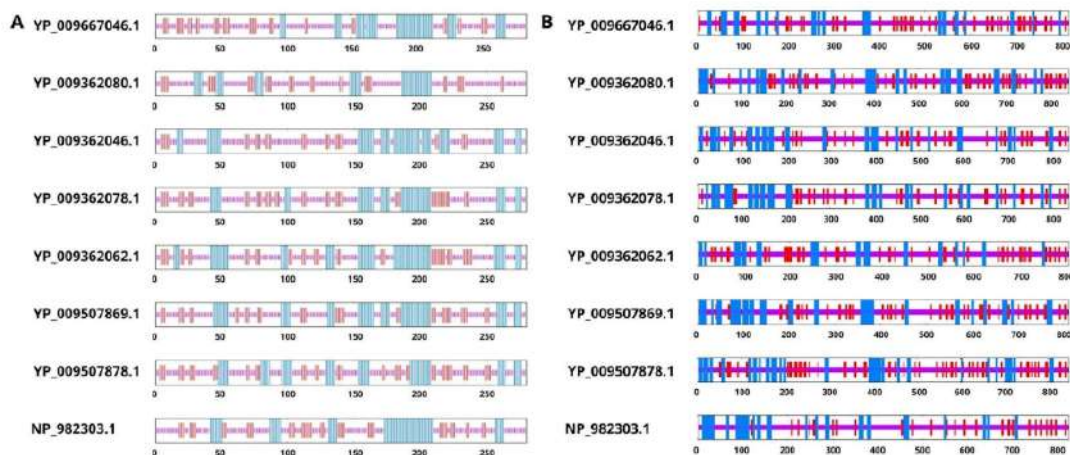
Figura 3: Propriedades físico-químicas das proteínas Gn (A) e Gc (B).

Legenda: Azul - resíduos polares não carregados (N, Q, S e T), verde - resíduos carregados positivamente (H, K e R) e salmão - resíduos carregados negativamente (D e E).

Os dados obtidos mostrados na Tabela 2 mostram que o dímero de Gn-Gc presente no envelope de *Orthobunyavirus* apresenta propriedades antigênicas que precisam ser exploradas, uma vez que todas as proteínas, independente do vírus analisado, demonstram que podem ser reconhecidas pelo sistema imune humano.

Proteínas de envelopes virais são alvos de anticorpos produzidos por células de defesa do hospedeiro, pois, como as mesmas estão expostas, ficam mais susceptíveis ao reconhecimento por parte do sistema imune (Bergamaschi; al., 2019). Por este motivo, vários trabalhos que utilizam ferramentas computacionais têm sido realizados para identificação de regiões presentes nestas proteínas que ajudam no desenvolvimento tanto de vacinas quanto de testes diagnósticos (Umitaibatin; al., 2023; Mahmoodi; Amirzakaria; Ghasemian, 2023; Ma; al., 2023).

No entanto, apesar de vários trabalhos nos últimos anos demonstrarem que precisamos avançar no conhecimento sobre os *orthobunyavirus*, estes vírus ainda permanecem negligenciados especialmente por falta de políticas públicas que incentivem a pesquisa e o desenvolvimento de medidas eficazes para minimizar o impacto dos mesmos na população brasileira (Zhang; al., 2023).

Figura 4: Estruturas secundárias das proteínas Gn (A) e Gc (B).

Legenda: Azul - alfa hélices, vermelho - folhas beta e magenta - alças em cada cadeia polipeptídica.

4 CONCLUSÃO

A partir deste estudo pode-se concluir que as proteínas dos *orthobunyavirus* analisados apresentam identidade entre 38 à 88% (Gn) e 28 à 73% (Gc), onde entre estas proteínas, Gn é mais conservada. Sobre as propriedades físico-químicas, as proteínas Gn tendem a ter um percentual maior de aminoácidos apolares, enquanto a Gc apresenta um equilíbrio entre os resíduos de aminoácidos polares e apolares.

Sobre os resíduos carregados, independente da proteína, os com maiores porcentagens são os não carregados, seguidos dos carregados positivamente e, por último, os carregados negativamente. Esta grande porcentagem de resíduos apolares se deve ao fato de estas proteínas possuírem regiões mergulhadas na bicamada lipídica que forma o envelope viral.

Quanto à estrutura secundária destas proteínas, elas apresentam um padrão similar, onde ambas possuem uma prevalência de folhas beta em relação às alfa hélices. E, por último, ambas apresentam propriedades antigênicas que são reconhecidas pelo sistema imunológico humano, o que sugere que essas proteínas podem ser alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos eficazes contra esses vírus.

Além disso, a análise das proteínas de envelope desses microrganismos destaca a importância de estudar a interação dessas proteínas com a célula hospedeira e sua capacidade de replicação viral.

Em contrapartida, a ausência de políticas públicas que incentivem a pesquisa e o desenvolvimento de medidas eficazes para lidar com os mesmos representa um desafio significativo. Portanto, é de suma importância que haja um maior investimento e suporte para a investigação desses vírus, a fim de avançar no conhecimento sobre sua biologia, epidemiologia e potenciais estratégias de controle.

REFERÊNCIAS

- BERGAMASCHI, G.; AL. et. Computational analysis of dengue virus envelope protein (e) reveals an epitope with flavivirus immunodiagnostic potential in peptide microarrays. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 8, p. 1921, 2019.
- COMBET, C.; AL. et. Nps@: Network Protein Sequence Analysis. **Trends Biochem Sci**, v. 25, n. 3, p. 147–150, 2000.
- DIAS, H. G.; SANTOS, F. B.; PAUVOLID-CORRÊA, A. An overview of neglected orthobunyaviruses in brazil. **Viruses**, v. 14, n. 5, p. 987, 2022.
- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in brazil: Challenges for clinic and implications for public health. **Rev. Saúde Pública**, v. 51, p. 30, 2017.
- DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. Vaxijen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 4, p. 1–7, 2007.
- FOSTER, J. E.; AL. et. Phylogenetic characterization of orthobunyaviruses isolated from trinidad shows evidence of natural reassortment. **Virus Genes**, v. 59, n. 3, p. 473–478, 2023.
- GUARDADO-CALVO, P.; REY, F. A. The viral class ii membrane fusion machinery: Divergent evolution from an ancestral heterodimer. **Viruses**, v. 13, n. 12, p. 2368, 2021.
- GUTIERREZ, B.; AL. et. Evolutionary dynamics of oropouche virus in south america. **J Virol**, v. 94, n. 5, 2020.
- HELLERT, J.; AL. et. Orthobunyavirus spike architecture and recognition by neutralizing antibodies. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 879, 2019.
- HOVER, S.; AL. et. Organisation of the orthobunyavirus tripodal spike and the structural changes induced by low ph and k⁺ during entry. **Nat Commun**, v. 14, n. 5885, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41205-w>.
- LEAL, C. S.; CARVALHO, C. A. M. In silico physicochemical characterization of fusion proteins from emerging amazonian arboviruses. **Life (Basel)**, v. 13, n. 8, p. 1687, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/life13081687>.
- LOZADA, C.; AL. et. Identification and characteristics of fusion peptides derived from enveloped viruses. **Front Chem**, v. 9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.689006>.
- MA, S.; AL. et. Development of a novel multi-epitope vaccine based on capsid and envelope protein against chikungunya virus. **J Biomol Struct Dyn**, p. 1–13, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2240059>.
- MAHMOODI, S.; AMIRZAKARIA, J. Z.; GHASEMIAN, A. In silico design and validation of a novel multi-epitope vaccine candidate against structural proteins of chikungunya virus using comprehensive immunoinformatics analyses. **PLoS One**, v. 18, n. 5, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285177>.
- MOREIRA, H. M. Outbreak of oropouche virus in frontier regions in western amazon. **Microbiol Spectr**, v. 12, n. 3, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01629-23>.
- OPAS/OMS - Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde. **Alerta Epidemiológico: Oropouche na Região das Américas**. Washington, D.C.: [s.n.], 2024. Alerta Epidemiológico. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/alertas-e-atualizacoes-epidemiologicas>. Acesso em: 09 mai. 2024.
- PEINADO, R. S.; EBERLE, R. J.; ARNI, R. K.; CONRADO, M. A. A review of omics studies on arboviruses: Alphavirus, Orthobunyavirus and Phlebovirus. **Viruses**, v. 14, n. 10, p. 2194, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v14102194>.
- PEREIRA, T. N.; VIRGINIA, F.; SOUZA, J.; MOREIRA, L. A. Emergent arboviruses: A Review About Mayaro Virus and Oropouche Orthobunyavirus. **Front Trop Dis**, v. 2, p. 737436, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fitd.2021.737436>.
- RICE, P.; LONGDEN, I.; BLEASBY, A. Emboss: The European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends Genet**, v. 16, n. 6, p. 276–277, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(00\)00204-2](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)00204-2).
- ROSA, J. F. T.; AL. et. Oropouche virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. **Am J Trop Med Hyg**, v. 96, n. 5, p. 1019–1030, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0672>.

SAYER, E. W.; AL. et. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 1, p. 20–26, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>.

SIEVERS, F.; AL. et. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using clustal omega. **Mol Syst Biol**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.

UMITAIBATIN, R.; AL. et. Immunoinformatics study: Multi-Epitope Based Vaccine Design from SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Vaccines (Basel)**, v. 11, n. 2, p. 399, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vaccines11020399>.

WHITE, J. M.; AL. et. Viral membrane fusion: A Dance Between Proteins and Lipids. **Annu Rev Virol**, v. 10, n. 1, p. 139–161, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-111821-093413>.

ZHANG, Y.; AL. et. Oropouche virus: A Neglected Global Arboviral Threat. **Virus Res**, v. 341, n. 199318, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2024.199318>.