

Análisis in silico de las alteraciones de la secuencia y estructura de RBD-SARS-CoV-2, que afectan su complementariedad por anticuerpos neutralizantes IgG-antiRBD

In silico analysis of the sequence and structure alterations of RBD-SARS-CoV-2, which affect its complementarity by IgG-antiRBD neutralizing antibodies

Ricardo Enrique Grados-Torrez^{1,a,z}, Leny Miroslava Osco Callisaya^{1,b,y}, Pamela Belen Ramos Torrez^{1,b,x}, Aryana Aleyda Chavez Alanoca^{1,b,w}, Esther Belen Vila Miranda^{1,b,v}, Aneth Vásquez Michel^{1,2,a,u}

Resumen

Las vacunas anti-SARS-CoV-2 inducen la producción de anticuerpos neutralizantes IgG contra el Dominio de Unión al Receptor de la proteína S del virus (IgG-antiRBD). En Bolivia, Sinopharm y Sputnik V fueron vacunas ampliamente utilizadas durante la pandemia. Sin embargo, las mutaciones y los cambios sufridos en SARS-CoV-2 fueron responsables de las nuevas olas de contagio. **Objetivo:** determinar las alteraciones a nivel de secuencia y de estructura del RBD-SARS-CoV-2, que afectan su complementariedad por anticuerpos neutralizantes IgG-antiRBD. **Material y Métodos:** se obtuvieron las secuencias y estructuras cristalográficas del RBD-SARS-CoV-2 a partir de la base de datos Protein Data Bank. Para el Alineamiento Múltiple de Secuencias y el Alineamiento Estructural, se emplearon Mega6 y Chimera 1.15. **Resultados:** el Alineamiento Múltiple de Secuencias y Alineamiento Estructural de las principales variantes epidemiológicas de SARS-CoV-2 evidencian que, krakenXBB1.5 fue la más divergente a nivel de secuencia, mientras que, omicronBA.2.75 presentó más cambios estructurales y mayores impedimentos estéricos al interactuar con IgG-antiRBD, siendo la más contagiosa y más evasiva a la respuesta inmunológica. **Conclusiones:** el uso de herramientas bioinformáticas para el seguimiento en los cambios moleculares de SARS-CoV-2 permiten predecir el comportamiento epidemiológico de nuevas variantes emergentes y además promover el mejoramiento en los criterios de prevención.

Palabras claves: biología molecular, biotecnología, inmunología, mutación, SARS-CoV-2

Abstract

Anti-SARS-CoV-2 vaccines induce the production of IgG neutralizing antibodies against the Receptor Binding Domain of the S protein of the virus (IgG-antiRBD). In Bolivia, Sinopharm and Sputnik V were widely used vaccines during the pandemic. However, the mutations and changes suffered in SARS-CoV-2 were responsible for the new contagion outbreaks. **Objective:** To determine the sequence and structure alterations of RBD-SARS-CoV-2, which affect its complementarity by IgG-antiRBD neutralizing antibodies. **Material and Methods:** The sequences and crystallographic structures of RBD-SARS-CoV-2 were obtained from the Protein Data Bank database. For Multiple Sequence Alignment and Structural Alignment, Mega6 and Chimera 1.15 were used. **Results:** The Multiple Sequence Alignment and Structural Alignment of the main epidemiological variants of SARS-CoV-2 showed that krakenXBB1.5 was the most divergent at the sequence level, while omicronBA.2.75 presented more structural changes and greater steric hindrances when interacting with IgG-antiRBD, being the most contagious and most evasive to the immune response. **Conclusions:** The use of bioinformatics tools for monitoring the molecular changes of SARS-CoV-2 make it possible to predict the epidemiological behavior of new emerging variants and also promote improvement in prevention criteria

Keywords: molecular biology, biotechnology, immunology, mutation, SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 contiene cuatro tipos de proteínas estructurales, entre ellas, la proteína de la espiga (S), las proteínas de la envoltura (E), las proteínas de membrana (M) y las proteínas de la nucleocápside (N)^{1,2}. La infección viral por SARS-CoV-2 depende de la proteína S, que es una

glucoproteína compuesta por subunidades S1 y S2, la cual se une a los receptores celulares ACE2 (receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2) del huésped mediante el Dominio de Unión al Receptor (RBD) de la subunidad S1, para posteriormente, ingresar a la célula a través de su fusión con la membrana celular, proceso favorecido por la subunidad S2³.

RBD es un blanco crítico para la unión tanto de compuestos antivirales, como de anticuerpos neutralizantes (Letko et al., 2020). SARS-CoV-2 RBD está formado por cinco hojas- β anti paralelas conectadas por bucles y hélices cortas. Entre estas cadenas anti paralelas se encuentra el Motivo de Unión al Receptor (RBM) cuya superficie es ligeramente cóncava (hacia adentro) para dejar espacio para el receptor ACE2, además, contiene la mayoría de los sitios de unión para este receptor⁴.

En Bolivia, desde que los primeros casos de SARS-CoV-2

¹Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

²Instituto de Servicios de Laboratorios de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS).

³Docente de Biología Molecular, Universidad Mayor de San Andrés.

⁴Estudiantes de la carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés.

^a<https://orcid.org/0000-0001-7287-2586>, ^z<https://orcid.org/0009-0004-8244-8999>

^b<https://orcid.org/0009-0006-2957-8967>, ^y<https://orcid.org/0009-0009-2712-6950>

^w<https://orcid.org/0009-0003-6472-1501>, ^v<https://orcid.org/0000-0002-3743-262X>

Correspondencia a: Ricardo Enrique Grados Torrez

Correo electrónico: ric.grados@gmail.com

Recibido el 20 de octubre de 2023. Aceptado el 30 de noviembre de 2023.

fueron detectados a inicios de 2020, se produjeron hasta el momento, seis distintas olas de contagio, siendo las dos primeras olas producidas por la variante original de SARS-CoV-2, mientras que las últimas cuatro, fueron a causa de variantes epidemiológicas que mutaron para transformarse en agentes mucho más contagiosos y evasivos para el sistema inmune, entre ellas, las variantes delta, omicron, centaurus y kraken, respectivamente⁵.

Desde que la OMS autorizó la administración de vacunas (noviembre, 2021), en Bolivia, las vacunas de Sinopharm y Sputnik V fueron algunas de las más aplicadas con 3 300 000 y 1 235 000 dosis, respectivamente^{6,7}. La vacunación genera IgG anti-RBD que evita la entrada del virus a la célula, estos anticuerpos neutralizantes (AcN) son considerados un buen marcador de respuesta humoral y su actividad puede medirse por varios métodos⁸. Sin embargo, debido a las mutaciones producidas en el genoma de SARS-CoV-2 a lo largo de la pandemia, que dio lugar a la generación de diferentes variantes y sub-variantes, la eficacia de las vacunas ha sido constantemente evaluada, incrementando el número de dosis (hasta 5 en Bolivia), mientras que la población actualmente padece de reinfecciones constantes que aún ponen en riesgo a los grupos etarios más vulnerables⁹.

Actualmente, las herramientas bioinformáticas y los estudios clínicos han jugado un rol trascendental en el seguimiento de las todas las modificaciones y sustituciones en la secuencia de la proteína S (spike) de SARS-CoV-2, que la convirtieron en distintas variantes de importancia clínica con capacidades de transmisión y evasión inmunológica mucho más altas que la original reportada en Wuhan, China. Es muy probable, que por medio de este tipo de aplicaciones moleculares in-silico, podamos monitorizar y predecir anticipadamente los potenciales riesgos de nuevas variantes emergentes de SARS-CoV-2 en nuestro país.

Material y métodos

Alineamiento Múltiple de Secuencias (MSA)

Las secuencias del Dominio de Unión al Receptor (RBD) de la espiga de SARS-CoV-2 wild type y de todas las variantes analizadas en este trabajo, fueron obtenidas de Protein Data Bank (PDB: <https://www.rcsb.org/>): 6lzg_wt, 7ekf_alpha, 7ekg_beta, 7ekc_gamma, 7w98_delta, 7t9l_omicron, 7ykv_centaurus y 8iov_kraken. Las secuencias correspondientes a RBD fueron determinadas con Chimera^{1,15}. El MSA fue realizado con el software Mega⁶, ajustando el umbral esperado a 0,05, con una penalización para gaps de 11 y empleando BLOSUM80 como matriz de sustitución para aminoácidos.

Comparación Estructural de variantes RBD-SARS-Cov-2

Como estructura de referencia se empleó la estructura tridimensional correspondiente al Dominio de Unión al Receptor (RBD) de la espiga de SARS-CoV-2 wild type (región que va desde 333 a 527 aa), cuya distribución espacial fue comparada con todas las variantes analizadas en este estudio (alpha, beta, gamma, delta, omicron, centaurus

y kraken). Se obtuvo el par de cadenas mejor alineadas incluyendo el alineamiento de las estructuras secundarias hasta que ninguno de los pares de cadenas exceda los 2.0 Å de distancia entre sí. Para determinar el grado de similitud en la distribución espacial de los átomos en las estructuras tridimensionales, se calculó la raíz cuadrada media (RMSD) de las posiciones atómicas, que es la distancia promedio entre los átomos de las cadenas principales de las proteínas superpuestas estructuralmente. Valores cercanos a 0 indican que las estructuras comparadas tienen un alto grado de similitud en su distribución espacial.

Interacción de variantes RBD-SARS-Cov-2 con IgG neutralizante

Para el análisis comparativo se utilizó la estructura cristalográfica del dominio de unión al receptor (RBD) de SARS-CoV-2 en complejo con el anticuerpo neutralizante CC12.1 (de tipo IgG específico para RBD) (PDB: 6xc2). A partir de este complejo, se realizaron las superposiciones estructurales del anticuerpo neutralizante CC12.1 con todas las variantes de SARS-Cov-2 analizadas en este trabajo, basándonos en los mismos criterios de alineamiento estructural mencionados en la anterior sección. Para encontrar posibles impedimentos estéricos y/o contactos entre átomos, se identificaron todos los átomos que estuvieran cercanos entre sí con un radio menor o igual a 0,6 Å, que es una distancia muy por debajo del radio de Van der Waals permitido para el átomo de Hidrógeno (el más pequeño), de esta forma poder encontrar los conflictos estéricos de mayor importancia.

Parámetros cuantitativos

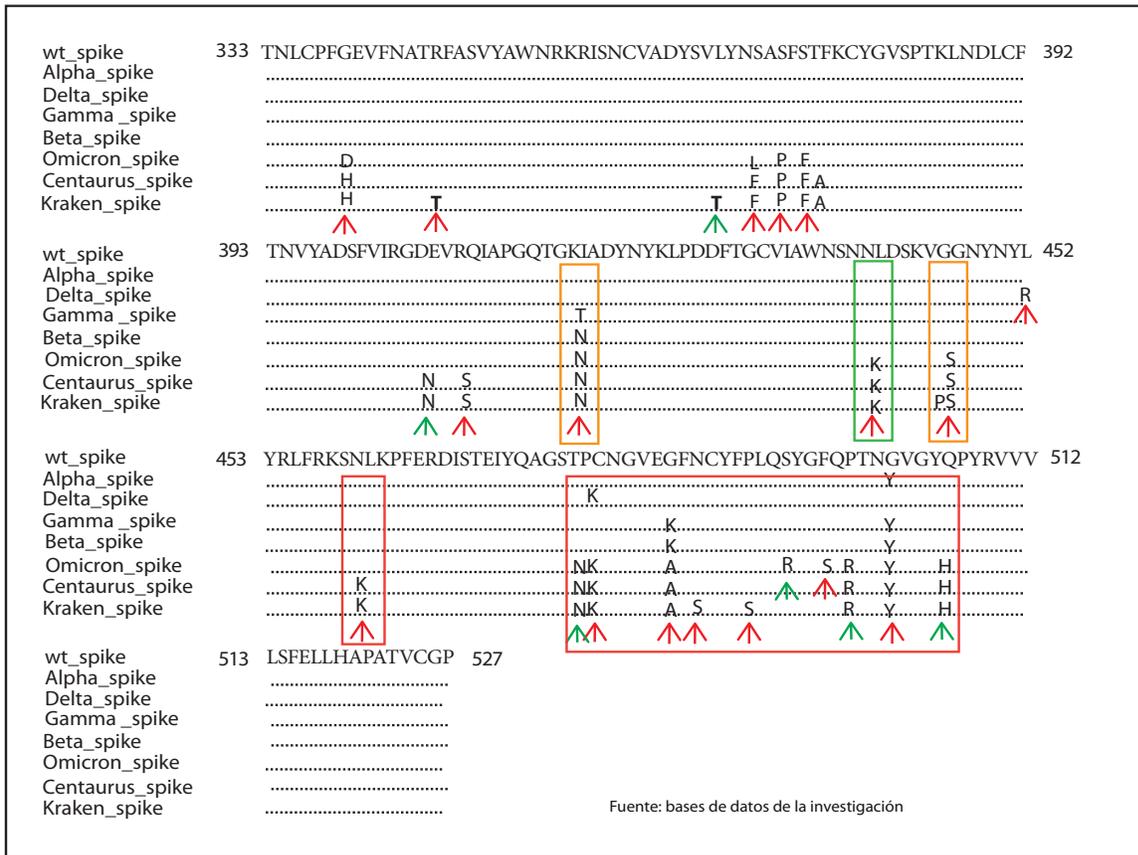
Para el Alineamiento Múltiple de secuencias de todas las variantes y sub-variantes de SARS-CoV-2 desarrolladas en este trabajo, se calculó el % de identidad, el MaxScore y el E-value, como parámetros cuantitativos. Para la comparación estructural del RBD de SARS-CoV-2, se calculó el RMSD (Desviación de la raíz cuadrada media) de las posiciones atómicas. El análisis de la complementariedad de las variantes y sub-variantes de RBD de SARS-CoV-2 con el AcN IgG-antiRBD se empleó la función del alineamiento estructural en Chimera 1.12 para calcular el número de todos los posibles impedimentos estéricos entre los átomos que participan en la interacción Ag-Ac.

Resultados

RBD_Kraken tiene el mayor % de variación

En el Alineamiento Múltiple de Secuencias de aminoácidos se observa que el Dominio de Unión al Receptor (RBD) de la espiga de SARS-Cov-2 perteneciente a la variante omicron y sus sub-variantes centaurus y kraken presentan un mayor número de aminoácidos mutados en comparación con la secuencia wild type (RBDwt SARS-CoV-2) (Figura 1). Estos aminoácidos mutados, se encuentran distribuidos a lo largo de toda la secuencia del RBD (333 – 527aa), sin embargo, las principales mutaciones se encuentran localizadas en las

Figura 1. MSA de la secuencia del RBD (333-527aa) de SARS-CoV-2 wt y las diferentes variantes de importancia clínica. Las mutaciones sinónimas y no sinónimas están señaladas con flechas verdes y rojas, respectivamente. Recuadro rojo: secuencia de interacción con IgG-antiRBD. Recuadro anaranjado: Sustituciones que producen impedimentos estéricos. Recuadro verde: sustituciones que mejoran la unión con ACE2 (Elaboración propia a partir de la base de datos del NCBI y el software Mega6).



regiones que posiblemente afectan la eficacia en la unión con los anticuerpos neutralizantes IgG (Figura 1, recuadro rojo).

Los parámetros cuantitativos como el E-value y %Identity basados en la matriz de sustitución BLOSUM80 (Tabla 1), señalan que la variante kraken es la que más difiere de su secuencia original.

RBD_Omicron es la más divergente a nivel estructural

La comparación estructural nos muestra que de acuerdo al valor calculado de RMSD, la variante con el valor RMSD más

alto (1,934) corresponde a la estructura del RBD de omicron, siendo la que presenta más diferencias a nivel estructural en comparación con RBD de SARS-CoV-2wt (Figura 2).

RBD_Omicron es la de menor complementariedad con AcN IgG-antiRBD

IgG-antiRBD interacciona con RBD de SARS-CoV-2wt formando 8 puentes de H2, sin embargo, el alineamiento estructural señala una disminución en los puentes de H2 cuando este anticuerpo neutralizante interacciona con la

Tabla 1. Parámetros cuantitativos del MSA (basados en BLOSUM80) entre RBD_SARS-CoV-2 wt y las diferentes variantes.

wt_spike vs,,,	Max, Score	Identities	MSA Parameters		
			Positives	E value	% Identity
Alpha_spike	399	194/195(99%)	194/195(99%)	3E-148	99,49
Delta_spike	397	193/195(99%)	193/195(98%)	1E-147	98,97
Gamma_spike	395	192/195(98%)	193/195(98%)	8E-147	98,46
Beta_spike	395	192/195(98%)	193/195(98%)	8E-147	98,46
Omicron_spike	371	180/195(92%)	184/195(94%)	3E-137	92,31
Centaurus_spike	366	178/195(91%)	182/195(93%)	2E-135	91,28
Kraken_spike	354	173/195(89%)	178/195(91%)	1E-130	88,72

Fuente: bases de datos de la investigación

Figura 2. Alineamiento Estructural entre RBD de SARS-CoV2wt (la primera cristalizada en Wuhan) y las diferentes variantes (Elaboración propia a partir de la base de datos PDB y el software Chimera1.15).

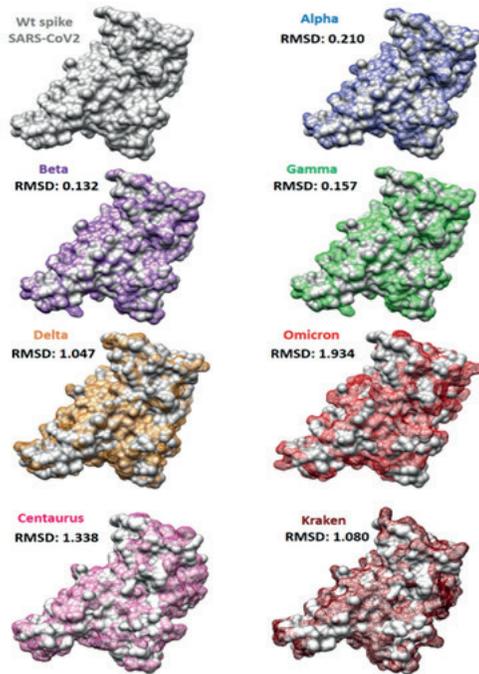
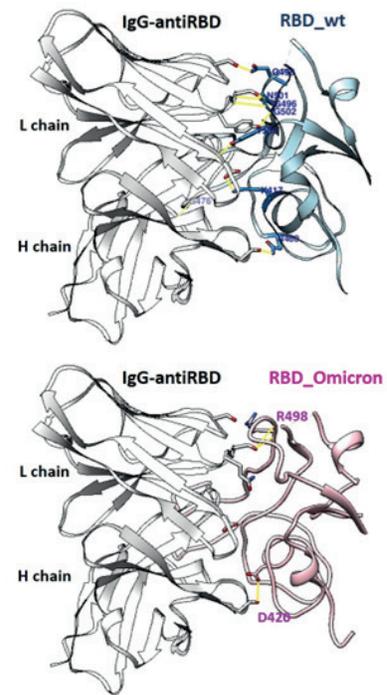


Figura 3. Puentes de H2 (líneas amarillas) en la interacción de IgG-antiRBD con RBD de SARS-CoV-2wt y omicron (Modelo de cintas) (Elaboración propia, PDB: 6xc2, software Chimera).



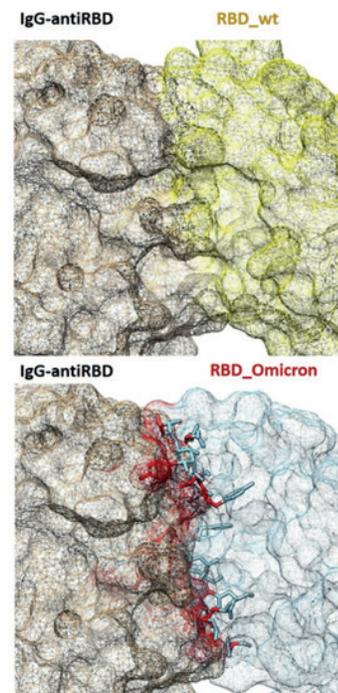
variante omicron (Figura 3). Por otra parte, el análisis de la superficie molecular de interacción nos muestra que la interacción entre IgG con la variante omicron produce 167 contactos no permitidos con un radio menor a 0,6 Å evidenciando la presencia de varios choques entre sus átomos (impedimentos estéricos) (Figura 4)

Figura 4. Impedimentos estéricos y posibles choques atómicos (rojo) en la interacción de IgG-antiRBD con RBD de SARS-CoV-2wt y omicron (Modelo de superficie molecular) (Elaboración propia, PDB: 6xc2, software Chimera).

Discusión

Desde que fue declarada la pandemia, hasta la actualidad, en la que se han desarrollado y aplicado diferentes tipos de vacunas en todo el mundo, el virus denominado como SARS-CoV-2 ha sufrido un proceso de mutación en su genoma, que le ha permitido dar origen a distintas variantes y sub-variantes que han ocasionado nuevos brotes de contagio. Entre las principales variantes registradas durante todo este periodo (2019 – 2023) se encuentran las variantes alpha, beta, gamma, delta, omicron y sus sub-variantes centaurus y kraken⁵.

Muchas de las mutaciones introducidas en el genoma de SARS-CoV-2, produjeron un cambio en la secuencia de aminoácidos de diferentes proteínas virales, sin embargo, las de mayor importancia clínica fueron los cambios producidos en la proteína S (spike) que es la encargada de interactuar con los receptores ACE2 para el ingreso del virus a las células, y también es el sitio de reconocimiento antigénico por el sistema inmune, más específicamente, la región de la proteína S denominada como Dominio de Unión al Receptor



(RBD) el cual también es el sitio de unión de los anticuerpos neutralizantes (AcN) IgG-antiRBD, que proporcionan inmunidad contra este virus^{4,10,11}.

El resultado del Alineamiento Múltiple de Secuencias señala que las principales mutaciones no conservadoras se encuentran en la región del Dominio de Unión al Receptor (RBD), siendo la sub-variante de omicron conocida como kraken, la que presentó un mayor número de mutaciones no conservadoras en su secuencia de aminoácidos, sin embargo, el grado de divergencia estructural calculado con base al valor RMSD nos indica que omicron es la variante con mayor divergencia estructural, debido a que no toda mutación en la secuencia de aminoácidos necesariamente se traduce en una alteración en la estructura tridimensional de la proteína. Como consecuencia, la variante omicron tuvo una reducción marcada en su capacidad de formar puentes de H2 y un incremento notable en el número de posibles impedimentos estéricos al interactuar con anticuerpos neutralizantes (IgG-antiRBD). Si realizamos una comparación de la estructura de cada aminoácido sustituido (Figura 1), podemos evidenciar que las sustituciones que favorecen impedimentos estéricos son los que sustituyen un aminoácido con cadena lateral pequeña a otro con una cadena lateral más voluminosa, como es en el caso de las sustituciones N501Y, Q498R, N460K y G496S. Aunque no se tomaron en cuenta otros tipos de interacciones como las iónicas, hidrofóbicas o de tipo Van der Waals; el valor elevado de RMSD, la reducción marcada en los puentes de hidrógeno y el alto número de átomos con contactos no permitidos entre RBD y AcN IgG, nos indican que la variante omicron podría ser la variante más evasiva para el sistema inmune en la población vacunada. Aunque en este trabajo no se realizó un análisis de la interacción de

SARS-CoV-2 con los receptores ACE2, estudios recientes indican que la mutación N439K (presente en omicron, centaurus y kraken) incrementa su afinidad por el receptor ACE2, reduciendo también el potencial de neutralización de sueros convalescentes¹²⁻¹⁴.

En Bolivia, los últimos reportes indican que se han producido nuevos picos de contagio con variantes de SARS-CoV-2. Un estudio genómico realizado por el Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) detectó en mayo de 2023, la presencia de la variante kraken en Bolivia, más propiamente en el eje troncal de La Paz y Cochabamba (9). Aunque aún no se han reportado estudios de los niveles de IgG-antiRBD en grupos de niños en edad escolar, es muy probable que, debido al bajo número de dosis de vacuna recibidas, estos grupos hayan sido los más vulnerables, tomando en cuenta que las nuevas variantes y sub-variantes como omicron, centaurus y kraken tienen mutaciones que le permiten escapar de la respuesta inmune y además incrementar su afinidad por receptores ACE2.

El uso de herramientas bioinformáticas y el análisis molecular nos permite no solamente describir los procesos relacionados con la mutación de agentes causales de enfermedades como el SARS-CoV-2, sino también, poder predecir si las futuras variantes podrían ocasionar problemas mucho más graves, con el fin de apoyar en la toma de decisiones concernientes a las medidas preventivas y de salud pública.

Conflicto de Intereses: los autores declaran que no existe conflicto de intereses

Agradecimientos

A Kevin Fermin Alaru Argani y Diego Alexander Perez Chamizo por su notable colaboración.

Referencias bibliográficas

- Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020; 1866(10):165878. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32544429/>
- Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10:587269. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33324574/>
- Du L, Yang Y, Zhang X. Neutralizing antibodies for the prevention and treatment of COVID-19. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(10):2293-306. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34497376/>
- Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(7):409-24. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34075212/>
- Seguimiento de las variantes del SARS-CoV-2. Publicado en la Organización Mundial de la Salud 2023. Disponible en: <https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
- El Presidente Luis Arce anuncia la llegada de 370.000 segundas dosis de Sputnik V hasta la próxima semana. Publicado en línea en el Viceministerio de Comunicación del Estado Plurinacional de Bolivia. Viceministerio de Comunicación del Estado Plurinacional de Bolivia. 2021. Disponible en: <http://www.comunicacion.gob.bo/?q=20210909/33179> [Citado 25 octubre 2021]
- Llegaron al país 370.000 segundas dosis de Sputnik V. Publicado en línea en el Viceministerio de Comunicación del Estado Plurinacional de Bolivia. Viceministerio de Comunicación del Estado Plurinacional de Bolivia. 2021. Disponible en: <http://www.comunicacion.gob.bo/?q=20210920/33212> [Citado 5 junio 2022]
- Bewley KR, Coombes NS, Gagnon L, et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nat. Protoc.* 2021; 16:3114-40. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41596-021-00536-y>
- INLASA detecta presencia de sub-variante kraken en Bolivia. 2023. Disponible en: <https://www.inlasa.gob.bo/2023/05/inlasa-detecta-presencia-de-sub-variante-kraken-en-bolivia/>
- Alqassieh R, Suleiman A, Abu-Halaweh S, Santarisi A, Shatnawi O, Shdaifat L, et al. Pfizer-BioNTech y Sinopharm: un estudio comparativo sobre los títulos de anticuerpos posteriores a la vacunación. *Vaccines (Basilea).* 2021;9(11):1223. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34835153/>
- Jacofsky D, Jacofsky EM, Jacofsky M. Comprender las pruebas de anticuerpos para COVID-19. *J Artroplasto.* 2020;35:S74-S81. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32389405/>
- Ming-Liang M, Da-Wei S, Li Y, Hong W, Lai DY, Jun-Biao X, et al. Systematic profiling of SARS-CoV-2-specific IgG responses elicited by an inactivated virus vaccine identifies peptides and proteins for predicting vaccination efficacy. *Cell Discov.* 2021;7(1):67. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34400612/>
- Xia S, Zhang Y, Wang Y, Wang H, Yang Y, Gao GF, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(1):39-51. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(20\)30831-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(20)30831-8/fulltext)
- Yuan M, Liu H, Wu NC, et al. Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2. *Science.* 2020;369(6507):1119-23. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32661058/>