

**Universidad Peruana Cayetano Heredia**

**Facultad de Ciencias y Filosofía**

**“Alberto Cazorla Talleri”**



**Susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2 de mamíferos acuáticos presentes en el Perú: estudio *in silico* de la interacción de spike con las proteínas de reconocimiento y procesamiento del virus**

Trabajo de Investigación para optar el Grado de Bachiller en Ciencias con mención en Biología

**Autores:**

Jose Maria Morales Muñoz

Yulissa Anali Tirado Gonzalez

**Asesora:**

Dra. Claudia Ines Gloria Machicado Rivero

Lima – Perú

2022

## Susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2 de mamíferos acuáticos presentes en el Perú: estudio in silico de la interacción de spike con las proteínas de reconocimiento y procesamiento del virus

### INFORME DE ORIGINALIDAD

9%	8%	4%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

### FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	2%
2	<a href="https://smf.org.mx">smf.org.mx</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="https://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="https://eprints.ucm.es">eprints.ucm.es</a> Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Unviersidad de Granada Trabajo del estudiante	1%
6	<a href="https://catalonica.bnc.cat">catalonica.bnc.cat</a> Fuente de Internet	<1%
7	Submitted to Engineers Australia Trabajo del estudiante	<1%
8	Nadia Fuentealba, Javier Panei, Gaston More, Maria Emilia Bravi et al. "Detección y	<1%

## **Tabla de contenido**

Resumen.....	4
Abstract.....	5
Estado del arte.....	7
1. Aspectos generales de la infección por SARS-CoV-2.....	7
1.1 Infección y respuesta inmune.....	7
1.2 Mecanismo de ingreso del virus al huésped.....	9
2. SARS-CoV-2: infección y susceptibilidad en animales.....	10
2.1 Reportes de infección natural.....	10
2.2 Estudios experimentales de la infección.....	10
2.3 Susceptibilidad a SARS-CoV-2 en animales.....	10
2.4 Aproximaciones teóricas para estudiar susceptibilidad.....	12
3. Presencia de coronavirus en ambientes acuáticos.....	13
3.1 Antecedentes de la presencia de coronavirus.....	13
3.2 El humano como vehículo transmisor de SARS-CoV-2 en el ambiente acuático.....	14
3.3 Dispersión de SARS-CoV-2 a través de aguas residuales.....	15
3.4 Viabilidad del SARS-CoV-2 en cuerpos de agua dulce y salada.....	15
Problema de investigación.....	17
Estrategia de abordaje.....	20
Bibliografía.....	21
Anexos.....	25

## Resumen

SARS-CoV-2 es un coronavirus zoonótico cuyo impacto se extiende más allá del ámbito de la salud humana, pues se ha reportado infección natural y experimental en animales, siendo el grupo de mamíferos el más afectado para ambos casos (1). Esta situación es preocupante, puesto que no sólo los animales domésticos están en riesgo sino también los que habitan ambientes naturales como el hábitat acuático. Se ha reportado la presencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales (2), lo que puede contribuir con la dispersión del virus por cuerpos de agua dulce y salada. También, la interacción directa entre personas y fauna marina facilita la propagación de SARS-CoV-2 (3).

Dado el potencial de SARS-CoV-2 de afectar la biodiversidad, los estudios *in silico* contribuyen a predecir la susceptibilidad de diversas especies al virus. Por ejemplo, mediante el análisis comparativo de secuencias de ACE2, se detectó a los mamíferos marinos como muy susceptibles (4,5). Algunos de estos mamíferos marinos son especies presentes en Perú; sin embargo, aún no existen estudios enfocados en la diversidad de mamíferos acuáticos de Perú. Además, el descubrimiento de nuevas proteínas involucradas en el reconocimiento y procesamiento del virus sugiere la importancia de realizar un estudio *in silico* integral para este grupo de animales. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la susceptibilidad a SARS-CoV-2 de mamíferos acuáticos del Perú que habitan cuerpos de agua dulce y salada en base al nivel de conservación de residuos claves para la unión de Spike en los receptores ACE2, NPR1 y AGTR2, y en las proteasas furina, TMPRSS2, catepsinas B/L (6) y TMPRSS4 (7). Para ello, se realizará una comparación de las secuencias de los ortólogos de estas proteínas. Además, se incluirán modelos 3D de interacción de los

complejos spike-receptor y spike-proteasa, y el cálculo de la energía libre de unión de los mismos, variables que aún no han sido integradas en su conjunto en los trabajos de investigación *in silico*. De esta manera, la estimación de la susceptibilidad de las especies de interés al virus motivaría futuros estudios *in vitro* e *in vivo* y contribuiría al entendimiento del impacto de SARS-CoV-2 en la biodiversidad acuática.

### **Palabras clave**

SARS-CoV-2, mamíferos acuáticos, susceptibilidad, análisis *in silico*, modelamiento de complejos

### **Abstract**

SARS-CoV-2 is a zoonotic coronavirus whose impact extends beyond the field of human health, since natural and experimental infection in animals has been reported, with the mammalian group being the most affected in both cases (1). This situation is alarming, since not only domestic animals are at risk but also those that inhabit natural environments such as aquatic habitats. The presence of SARS-CoV-2 has been reported in wastewater (2), which may contribute to the spread of the virus in fresh and salt water bodies. Also, direct interaction between humans and marine wildlife facilitates the spread of SARS-CoV-2 (3).

Given the potential of SARS-CoV-2 to affect biodiversity, *in silico* studies help to predict the susceptibility of various species to the virus. For example, by comparative analysis of ACE2 sequences, marine mammals were detected as highly susceptible (4,5). Some of these marine mammals are species present in Peru; however, there are still no studies focused on the diversity of aquatic mammals in Peru. In addition, the discovery of new proteins involved in virus recognition and processing suggests the

importance of performing a comprehensive *in silico* study for this group of animals. Therefore, the present work aims to determine the susceptibility to SARS-CoV-2 of Peruvian aquatic mammals inhabiting freshwater and saltwater bodies based on the level of conservation of key residues for Spike binding, present in ACE2, NPR1 and AGTR2 receptors, and in furin, TMPRSS2, cathepsins B/L (6) and TMPRSS4 (7) proteases. For this purpose, a comparison of the sequences of the orthologs of these proteins will be performed. In addition, 3D models of interaction of spike-receptor and spike-protease complexes will be included and the calculation of their binding free energy, variables that have not yet been integrated as a whole in *in silico* research works. Thus, estimating the susceptibility of the species of interest to the virus would motivate future *in vitro* and *in vivo* studies and contribute to the understanding of the impact of SARS-CoV-2 on aquatic biodiversity.

**Key words**

SARS-CoV-2, aquatic mammals, susceptibility, *in silico* analysis, complex modeling

## **Estado del arte**

### **1. Aspectos generales de la infección por SARS-CoV-2**

El coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) se ha diseminado alrededor del mundo y representa en la actualidad aproximadamente 390 millones de casos de infectados (8). Respecto a su origen, algunos estudios lo atribuyen al murciélago, mientras que el pangolín y la civeta serían los agentes intermediarios (9).

En relación a la epidemiología, es capaz de infectar a animales y humanos e inclusive los contagios pueden ocurrir a través de individuos asintomáticos infectados (9). La principal forma de transmisión es a través de gotas y aerosoles tras contacto directo o en espacios cerrados, pero también se puede diseminar a través de la orina y heces. Los síntomas más comunes descritos en humanos son fiebre, dolor muscular, tos, náusea, entre otros. No obstante, Sars-CoV-2 es capaz de ocasionar falla de múltiples órganos, como pulmones, corazón y riñones; y a nivel patológico desencadena neumonía y edema pulmonar (9).

#### **1.1 Infección y respuesta inmune**

Respecto al ciclo infectivo, el mediador inicial es la proteína viral spike (S), existiendo entre 24 a 40 de estas proteínas en la superficie de la partícula viral. Su principal característica es la flexibilidad, ya que realizan movimientos rotacionales. Ello permitiría al virus encontrar con mayor facilidad el receptor y que múltiples proteínas S se unan a la superficie de la célula huésped (10). El principal receptor de la célula hospedera es ACE2, el cual reconoce la porción RBD de spike. Un punto importante es que cambios o mutaciones en RBD pueden estabilizar la unión con el receptor. Esta es

una de las razones por la que SARS-CoV-2 se une con mayor fuerza al receptor que SARS-CoV y por la que algunas variantes de SARS-CoV-2 presentan mayor infectividad (10). Por otro lado, ACE2 se ubica mayormente en células del tracto respiratorio, pero también en otros órganos, lo que explica la diversidad de tropismos de SARS-CoV-2.

Posterior al reconocimiento del virus, otras proteínas del hospedero realizan modificaciones en el virus, ello permite que se fusionen membranas y el ARN viral ingrese al interior de la célula. A partir de aquí, el material genético es traducido resultando en la producción de 26 proteínas: virales, estructurales y accesorias. Después de la formación de la partícula viral, algunas de las proteínas spike interactúan con la membrana del hospedero y activan canales de calcio que permiten la expulsión de una envoltura de ácidos grasos. Esto conlleva a que otras células que expresan ACE2 se unan a la célula infectada, resultando así en la diseminación del virus. A estas estructuras se les denomina sincitios, y se ha encontrado estas formaciones inclusive con linfocitos, planteándose así un mecanismo de evasión inmune. Finalmente, SARS-CoV-2 es expulsado de la célula hospedera a través del aparato de Golgi o de los lisosomas (10).

Otro suceso paralelo al ingreso del virus es la respuesta inmune del hospedero, ya sea innata o adaptativa. La activación de monocitos, neutrófilos u otras células de la inmunidad adaptativa conlleva al incremento de citocinas proinflamatorias. Por ejemplo, en pacientes con COVID-19 severo, ocurre un incremento de la expresión de IL6, TNF $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , MCP3, GM-CSF, IL2 e IP-10, ello acompañado de una elevación de quimioquinas (11). En el caso de las citocinas, su incremento está asociado al



desarrollo de neumonía, formación de edemas pulmonares y con el agotamiento y pérdida de función de células T efectoras. Otro punto importante es que la transcripción de genes antivirales disminuye debido a la menor producción de interferones tipo I y III y al aumento de la producción de quimioquinas (11).

## **1.2 Mecanismo de ingreso del virus al huésped**

De particular relevancia en el ciclo infeccioso de SARS-CoV-2 es el mecanismo molecular de ingreso del virus. Para ello es necesario la acción complementaria de receptores y proteasas presentes en el hospedero. Estas proteínas se caracterizan por su interacción con la proteína spike S del virus. En el contexto de estas interacciones, el virus puede ingresar por dos vías, siendo una de ellas la vía rápida, mediada por el reconocimiento de ACE2, principalmente, y que conlleva a la modificación del virus por proteasas ubicadas en la superficie de la célula. La segunda vía de ingreso del SARS-CoV-2 es por la vía endocítica mediada por clatrininas, que provoca la modificación viral en el interior del endosoma por acción de proteasas (12).

En cuanto al grupo de receptores encontramos a ACE2, NPR1 y AGTR2 (6,13). ACE2 es el receptor primario e indispensable para el reconocimiento del virus, se encuentra en los pulmones, intestino, riñones, corazón, entre otros. NPR1 facilita el ingreso de SARS-CoV-2 pero no es esencial, es expresada en el epitelio respiratorio y olfativo. AGTR2 presenta una alta afinidad por S y se encuentra principalmente en pulmones (13). Por otro lado, para la fusión de membranas del virus con la célula hospedera se requiere de la activación de la proteína S. El corte por las proteasas es realizado entre la sección S1 y S2 de la proteína S, donde S1 es eliminado y el péptido de fusión de S2 es expuesto. Entre las principales proteasas encontramos a TMPRSS2, TMPRSS4, furina y

cathepsinas B/L. TMPRSS2 se encuentra en pulmones, corazón, hígado y riñón. Además de ello, estudios demuestran la coexpresión tanto de TMPRSS2 como TMPRSS4 con ACE2 (6,7). La furina se encuentra principalmente en el intestino y se ha planteado su acción en un sitio específico entre S1/S2 diferente al de las otras proteasas. Finalmente las cathepsinas se encuentran en endosomas y también procesan la porción S1/S2 de spike (6).

## **2. SARS-CoV-2: infección y susceptibilidad en animales**

### **2.1 Reportes de infección natural**

Se ha informado de la infección por SARS-CoV-2 en animales domésticos como gatos y perros (1,14). También, se han reportado casos en animales salvajes en cautiverio como leones, tigres, leopardo de las nieves, pumas, y en primates no humanos como gorilas (14). La infección por SARS-CoV-2 afectó gravemente a las granjas de visones y existe evidencia de transmisión de animal a humano y de animal a animal de una variante (1).

### **2.2 Estudios experimentales de la infección**

De manera experimental, se ha demostrado la infección por SARS-CoV-2 en felinos, perros, murciélagos frugívoros, hurones, hamsters dorados, primates no humanos, conejos y ratones transgénicos (15). Las últimas 5 especies mencionadas pueden servir como modelos experimentales de la infección por SARS-CoV-2. Un estudio *in vitro* realizado en cultivos celulares (16) sugiere que una amplia gama de animales domésticos, incluidos camellos, vacas, caballos, cabras, ovejas, gatos y conejos, podrían ser susceptibles.

### **2.3 Susceptibilidad a SARS-CoV-2 en animales**

Diversos estudios *in silico* han explorado la susceptibilidad de los animales a una infección por SARS-CoV-2 (4,5,17,18). Damas y colaboradores (4) analizaron las secuencias de ACE2 de 410 especies de vertebrados, incluyendo 252 mamíferos. En base a los resultados, los vertebrados fueron clasificados en 5 categorías por su riesgo a infectarse por SARS-CoV-2 (muy alto, alto, medio, bajo y muy bajo riesgo). Todos los peces, anfibios, reptiles y aves tomados en cuenta para el estudio presentan riesgo bajo y muy bajo de infectarse por SARS-CoV-2. Las especies de riesgo medio a muy alto fueron 103, siendo todos mamíferos. Solo primates catarrinos conformaron la categoría muy alta, mientras que la categoría alta destacó por albergar a 12 de los 14 cetáceos estudiados. La categoría media fue ocupada por 57 especies, entre felinos, primates, roedores, lagomorfos, varios artiodáctilos y un cetáceo.

En otro estudio (17), y utilizando un enfoque metodológico distinto, se predijo la susceptibilidad de 215 especies de vertebrados al SARS-CoV-2. En general, predijeron un alto riesgo de infección para la mayoría de los mamíferos, exceptuando a todos los mamíferos no placentarios. Veintiséis de los mamíferos con riesgo de infección se encuentran en entornos domésticos, agrícolas o zoológicos. Este estudio, al igual que el de Damas et al. (4), mostró que es probable que las aves, peces y reptiles no sean susceptibles, salvo pocas excepciones. Ambos trabajos también concuerdan en el riesgo de infección que presenta el grupo de los cetáceos.

Al respecto, existen estudios enfocados en mamíferos marinos (5,18). Audino y colaboradores (5) analizaron las secuencias de ACE2 de cetáceos de las costas italianas. De las 9 especies de cetáceos que se estudiaron, se predijo que 7 eran altamente susceptibles y 2 de susceptibilidad media. Mathavarajah y colaboradores (18) reportaron

que 18 de los 21 cetáceos seleccionados se ubicaron en las categorías de susceptibilidad alta y muy alta. Además, 8 de los 9 pinnípedos fueron clasificados como altamente susceptibles.

#### **2.4 Aproximaciones teóricas para estudiar susceptibilidad**

En general, se han utilizado 2 formas para estudiar la susceptibilidad de los animales al SARS-CoV-2: mediante análisis de secuencias primarias (4,5,18) o por análisis estructural (17,19). También, la gran mayoría de estudios se han basado en ACE2, dejando relegadas a otras proteínas involucradas en el ingreso del virus. Damas et al. (4) analizaron las secuencias de ACE2 de 410 especies de vertebrados y diseñaron un sistema de puntuación de unión de cinco categorías basado en el grado de conservación de 25 aminoácidos importantes para la unión entre ACE2 y la proteína spike. En cuanto a su capacidad predictiva, esta parece ser buena. Incluyeron a los pocos animales de los que se conocía su condición frente al SARS-CoV hasta ese momento (11 en total), y su clasificación fue consistente, exceptuando un caso (hurón).

Lam y colaboradores (17) moderaron complejos Spike-ACE2 de 215 especies de vertebrados para así calcular los cambios en la energía del complejo causados por mutaciones en cada especie en relación con el ACE2 humano. Correlacionando estos cambios en la energía libre con los datos de infección por COVID-19, propusieron un valor de corte. Al aplicar este umbral, predijeron correctamente que los 32 animales con evidencia experimental de infección están en riesgo. Sin embargo, para 3 animales que predijeron en riesgo, los estudios experimentales *in vitro* hasta la fecha no habían mostrado infección.

Piplani y colaboradores (19) también moderaron complejos Spike-ACE2 de 10 animales relevantes. Curiosamente, el ACE2 del pangolín mostró la afinidad de unión más alta después de la del humano, a pesar de tener una similitud de secuencia relativamente baja. En contraste, la afinidad de ACE2 del mono (*Macaca fascicularis*) fue mucho menor a pesar de su alta similitud de secuencia con el ACE2 humano. Estas diferencias resaltan la necesidad de un enfoque estructural frente a uno basado solo en secuencias. De hecho, Damas et al. (4) contradicen a este estudio al clasificar al pangolín como de riesgo muy bajo.

### **3. Presencia de coronavirus en ambientes acuáticos**

#### **3.1 Antecedentes de la presencia de coronavirus**

Se ha detectado la presencia de coronavirus (CoVs) en ambientes acuáticos de América, Asia, Australia y Europa, ya sea en cuerpos de agua dulce o en aguas residuales pero no en ambientes marinos. En este último caso, la alta tasa de decaimiento de CoVs debido a la salinidad y el efecto de dilución de los océanos representan las razones por las que los CoVs no persisten por un periodo largo de tiempo en el mar (20). No obstante, pese a que la ruta de transmisión no ha sido identificada, hasta la fecha se han reportado casos puntuales de infección de mamíferos acuáticos por CoVs. Por ejemplo, los alfacoronavirus y gammacoronavirus han ocasionado enfermedades respiratorias en pinnípedos y cetáceos, respectivamente (20,21). En el caso de los betacoronavirus, grupo al que pertenece SARS-CoV-2, aún no hay reportes ni se han realizado estudios *in vitro* que demuestran su infectividad en mamíferos acuáticos.

Por otro lado, si bien es cierto, gammacoronavirus y alfacoronavirus comparten poca homología con SARS-CoV-2 y su ingreso es mediado por receptores distintos a ACE2,

en gammacoronavirus de animales se ha identificado que los pasos de su ciclo infectivo: entrada, replicación y diseminación, son similares a los betacoronavirus humanos (20). Respecto a la transmisibilidad de CoVs en mamíferos acuáticos, este punto aún no ha sido estudiado pero se sugiere que en el caso de SARS-CoV-2 este sería transmitido por las mucosas membranosas como ojos, espiráculos o boca (22). Esto es concordante con las rutas de transmisión de otros virus respiratorios de mamíferos acuáticos como Morbillivirus. Por ejemplo, los morbillivirus se transmiten a cetáceos mediante partículas de aerosol o por contacto directo a través del tracto respiratorio, ojos, boca, tracto urogenital o heridas en la piel (23). Además de ello, la preocupación por la transmisibilidad de virus respiratorios como SARS-CoV-2 parte del comportamiento gregario de muchas especies de cetáceos (21).

Finalmente, es importante mencionar que los estudios que evalúan la infección viral de organismos acuáticos a nivel epidemiológico son escasos y los que han sido reportados se han centrado en animales muertos varados en la costa o en aquellas especies asociadas a la acuicultura, industria o al turismo (21). Otro punto, es que en la actualidad las restricciones de la pandemia han representado un impedimento para realizar estudios in situ de infección viral en el hábitat marino. Por lo tanto, la data de infección de mamíferos marinos con la que se cuenta puede no ser un reflejo exacto de la situación actual. Y debido a la historia de infección de mamíferos acuáticos por virus respiratorios se requiere a futuro un mayor esfuerzo para explorar este aspecto epidemiológico.

### **3.2 El humano como vehículo transmisor de SARS-CoV-2 en el ambiente acuático**

Barbosa y colaboradores (3) evaluaron el riesgo de transmisión zoonótica inversa a la

vida silvestre antártica, considerando la susceptibilidad del hospedador, la dinámica de infección en humanos y el contacto directo entre las personas con la vida silvestre antártica (incluye cetáceos y pinnípedos). Las actividades de investigación y turismo son las que más riesgo asociados presentan. Los espacios cerrados, como los de las estaciones y barcos de investigación o los cruceros turísticos, podrían permitir una mayor transmisión del SARS-CoV-2 entre humanos, y al entrar en contacto con la fauna en diferentes ubicaciones, el virus podría propagarse por todo el continente.

### **3.3 Dispersión de SARS-CoV-2 a través de aguas residuales**

Se ha detectado ARN de SARS-CoV-2 en aguas residuales municipales, lodos derivados de plantas de tratamiento, agua no potable y en ríos (2). Los residuos fecales y las mascarillas son considerados las principales fuentes de transmisión del coronavirus a través de las aguas residuales y ríos. El tiempo promedio de viabilidad del SARS-CoV-2 en muestras de heces de personas infectadas es de 22 días (RIC de 17-31 días), convirtiéndolos en “bancos” de partículas virales. Por otro lado, la gran cantidad de mascarillas faciales utilizadas en todo el mundo se desechan sin aplicar algún tratamiento de desinfección, especialmente en países en vías de desarrollo.

Las aguas residuales que desembocan en el mar son la ruta más probable para el ingreso del SARS-CoV-2 en aguas costeras. Utilizando un modelo biofísico basado en diferentes parámetros de vida media del coronavirus, se evaluó la posible contaminación producida por 25 desagües de aguas residuales municipales en el mar de Bohai, China (24). La información proporcionada por el modelo fue a través de mapas de concentración viral que muestran cambios espaciales y temporales alrededor de las áreas marinas adyacentes a los puntos de emisión de aguas residuales. Con esta

aproximación se pueden establecer las áreas vulnerables para los mamíferos marinos y los usuarios de balnearios.

### **3.4 Viabilidad del SARS-CoV-2 en cuerpos de agua dulce y salada**

Se determinó la tasa de descomposición, expresados en  $T_{90}$ , de partículas infecciosas viables de SARS-CoV-2 y del ARN en agua de río y de mar de Dublín (25). Se encontró que la persistencia del SARS-CoV-2 viable era mayor a bajas temperaturas y en agua dulce. El tiempo requerido para que el 90% de las partículas viables se hayan desactivado en agua de río fue de 2.3 y 3.8 días a 20°C y 4°C, respectivamente; mientras que en agua marina fue de 1.1 y 2.2 días a 20°C y 4°C, respectivamente. Otro estudio en Brasil calculó que en agua de río el  $T_{90}$  del SARS-CoV-2 es de 1.9 días a 24°C y 7.7 días a 4°C (26), siendo el valor reportado en la mayor temperatura similar al trabajo anterior, pero no el de 4°C, donde se presenta una discrepancia de casi el doble del  $T_{90}$ .

La viabilidad del SARS-CoV-2 también depende del contenido de sólidos (turbidez) presentes en el agua (26). De hecho, el coronavirus permanece viable más tiempo en aguas filtradas comparado con las que no lo están: el  $T_{90}$  de agua de río y aguas residuales a 24°C incrementó de 1.9 a 3.3 días y de 1.2 a 1.5 días, respectivamente. Este mismo patrón se observa al comparar el tiempo de descomposición entre el agua de río (menos turbia) con la de las aguas residuales (más turbia).



### **Problema de investigación**

El coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) representa en la actualidad una problemática en la salud global, pues ha causado la muerte de más de 5.5 millones de personas hasta la fecha (8). Sin embargo, no sólo afecta a humanos, pues también se han registrado casos de infección natural y experimental en animales (1,14,15,16). Debido a ello, se han venido realizando estudios *in silico* de susceptibilidad a infección por SARS-CoV-2 en animales, a través del análisis de ortólogos de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2). Es así que se predijo que diversas especies de mamíferos son susceptibles, como los mamíferos marinos, quienes presentaron un riesgo elevado de ser infectados por SARS-CoV-2 (4,5,18). Algunos de estos mamíferos marinos susceptibles se encuentran en Perú, por lo que representaría un impacto negativo del SARS-CoV-2 en la biodiversidad de mamíferos presentes en el país. Sin embargo, pese a que el Perú registra una gran diversidad de mamíferos acuáticos (27,28), aún no se han realizado estudios *in silico* de susceptibilidad a infección a SARS-CoV-2 enfocados en mamíferos que habitan cuerpos de agua dulce y salada en el país.

Si bien es cierto no hay registros de casos ni estudios *in vitro* sobre la infección de

SARS-CoV-2 en mamíferos acuáticos, en las últimas décadas se ha detectado que otros géneros de coronavirus, como alfacoronavirus y gammacoronavirus, han infectado pinnípedos y cetáceos, respectivamente (20,21). Aunque SARS-CoV-2 no está muy emparentado filogenéticamente con los grupos de coronavirus mencionados, comparten mecanismos moleculares del ciclo infeccioso similares (20). Además, la dispersión del SARS-CoV-2 por ambientes acuáticos a través de aguas residuales es un riesgo latente, más aún en países con un sistema de tratamiento de aguas servidas poco eficiente como el nuestro (2,18). Cabe mencionar que los estudios epidemiológicos de infecciones virales en poblaciones acuáticas no son frecuentes. Ocasionalmente se ha detectado infección sólo en mamíferos acuáticos varados o asociados a actividades como acuicultura, industria o turismo (21). Asimismo, la pandemia actual ha sido un punto limitante para realizar investigaciones *in situ* en animales, debido a las restricciones impuestas y a condiciones de bioseguridad exigidas. Por lo tanto, se requiere a futuro un mayor esfuerzo para estudiar a nivel epidemiológico la infección de mamíferos acuáticos a SARS-CoV-2.

Por otro lado, la mayoría de estudios *in silico* en animales se centran en ACE2 y no se analizan otras proteínas involucradas en el ingreso del virus, esto debido a que desde un inicio se estableció a ACE2 como el receptor principal para la entrada del SARS-CoV-2. Sin embargo, paulatinamente se han ido descubriendo proteínas relevantes en el mecanismo de ingreso. Entre ellas se encuentran receptores y proteasas que interactúan con spike. Además de ACE2, NPR1 y AGTR2 funcionan como receptores complementarios a ACE2 (6,13). En el caso de las proteasas encontramos a TMPRSS2, TMPRSS4 (7), furina y catepsinas B/L, un grupo de ellas presentan un rol complementario, pero otras son esenciales (6). Por ejemplo, TMPRSS2 es esencial ya

que sin el procesamiento de esta proteasa no habría fusión de membranas del virus con la célula hospedera. En ese sentido, un análisis integral de estas proteínas involucradas en reconocimiento y procesamiento del virus contribuiría a una predicción más exacta para la susceptibilidad. Un estudio de esta naturaleza aún no ha sido aplicado para los mamíferos acuáticos. Otro punto es que los estudios *in silico* en mamíferos acuáticos se centran en el análisis de secuencias (4,5,18), más no en el modelamiento estructural ni en el cálculo de la energía libre de unión del complejo. Si bien es cierto, existen estudios que emplean los dos últimos aspectos mencionados (17,19), estos realizan el modelamiento estructural en base a spike-ACE2 y sólo para especies seleccionadas del amplio espectro de animales. La mayoría de especies de mamíferos acuáticos suelen ser excluidas del análisis estructural; por ejemplo, Lam y colaboradores (17) incluyen solo 2 especies de mamíferos acuáticos mientras que Piplani et al. (19) no consideraron ninguna.

Por lo tanto, incluir diversas proteínas de reconocimiento y procesamiento del SARS-CoV-2 permitiría obtener un panorama más integral. Además, realizar un análisis en función de la interacción de spike con las proteínas del reconocimiento molecular y procesamiento del virus contribuiría con predicciones aún más robustas. Finalmente, predecir la susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2 de los mamíferos acuáticos en el Perú es importante, pues algunas de estas especies se encuentran amenazadas (29). Saber cuáles son las que presentan mayor riesgo de contagio ayudaría a concentrar los esfuerzos de protección.

### **Estrategia de abordaje**

Para estimar la susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2 de mamíferos acuáticos de Perú presentes en cuerpos de agua dulce y salada, nos basaremos parcialmente en la metodología propuesta por Damas et al. (4). Las proteínas que se analizarán son los receptores ACE2, NPR1 y AGTR2, y las proteasas TMPRSS2, TMPRSS4, furina y catepsinas B/L. Para 6 especies, las secuencias de las proteínas del estudio se encuentran en NCBI y Uniprot (ANEXO 1), mientras que para 14 especies se deducirán las secuencias de proteínas a partir del genoma ensamblado usando AUGUSTUS v3.3.2 o CESAR v2.0. Luego, las secuencias de las proteínas serán alineadas en Clustal Omega, y la clasificación de las sustituciones de los aminoácidos (conservativas, semi conservativas y no conservativas) se basará en el criterio de este programa. Además, para cada proteína, las especies a estudiar serán clasificadas según la predicción de su vulnerabilidad mediante el sistema de puntuación propuesto por Damas et. al. Este sistema está basado en el grado de conservación de los aminoácidos críticos que interactúan con Spike. La puntuación dependerá de qué tanto los residuos de la proteína

se asemejen a su par humano, así como del número y tipo de sustituciones presentadas. Los aminoácidos críticos en la interacción con Spike son 25 para ACE2 (4), 16 para AGTR2 (13), 8 para NPR1, 28 para TMPRSS2 y 9 para furina (30). Para las proteínas TMPRSS4 y catepsinas B/L, se utilizará como referencia los dominios que incluyen al sitio activo puesto que aún no se han identificado los residuos críticos que interactúan con Spike (31,32).

Por otro lado, debido a que las proteínas mencionadas interactúan con spike de SARS-CoV-2, se realizará un modelamiento molecular 3D de los complejos formados. Para ello, utilizando la metodología usada por Piplani et al. (19) primero se realizará el modelamiento por homología de las proteínas de cada especie, en caso dichas estructuras no estén disponibles en repositorios de modelamiento como Alphafold o SWISS-MODEL repository. Luego, las estructuras serán refinadas y optimizadas en DeepRefiner. Su calidad será evaluada (antes y después del refinamiento) usando plots de Ramachandran y molprobit scores en SWISS-MODEL. En el caso de la proteína spike, su estructura será obtenida del PDB. Posteriormente, el modelamiento de los complejos formados por spike con las proteínas de interés se realizará con HDOCK. Luego, se obtendrán las energías libres de unión de los complejos con GROMACS. Los resultados serán tabulados en una matriz, por especie y proteína.

## **Bibliografia**

1. Mahdy M, Younis W, Ewaida Z. An Overview of SARS-CoV-2 and Animal Infection. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;7.
2. Tran H, Le G, Nguyen D, Juang R, Rinklebe J, Bhatnagar A et al. SARS-CoV-2 coronavirus in water and wastewater: A critical review about presence and concern. *Environmental Research*. 2021;193:110265.
3. Barbosa A, Varsani A, Morandini V, Grimaldi W, Vanstreels R, Diaz J et al. Risk assessment of SARS-CoV-2 in Antarctic wildlife. *Science of The Total Environment*. 2021;755:143352.
4. Damas J, Hughes GM, Keough KC, Painter CA, Persky NS, Corbo M, et al. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(36):22311–22.

5. Audino T, Grattarola C, Centelleghes C, Peletto S, Giorda F, Florio CL, et al. SARS-CoV-2, a Threat to Marine Mammals? A Study from Italian Seawaters. *Animals*. 2021;11(6):1663.
6. Masre SF, Jufri NF, Ibrahim FW, Abdul Raub SH. Classical and alternative receptors for SARS-CoV-2 therapeutic strategy. *Reviews in Medical Virology*. 2020
7. Wruck W, Adjaye J. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is co-expressed with genes related to transmembrane serine proteases, viral entry, immunity and cellular stress. *Scientific Reports*. 2020;10(1).
8. COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center [Internet]. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. 2021 [cited 2021 Sep 15]. Available from: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
9. Yang Y, Xiao Z, Ye K, He X, Sun B, Qin Z, et al. SARS-CoV-2: characteristics and current advances in research. *Virology*. 2020;17(1):1–17.
10. Scudellari M. How the coronavirus infects our cells. *Nature* [Internet]. 2021;595(July):640–4.
11. Shah VK, Firmal P, Alam A, Ganguly D, Chattopadhyay S. Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. *Front Immunol*. 2020;11(August):1–17.
12. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2021. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34611326/>
13. Cui C, Huang C, Zhou W, Ji X, Zhang F, Wang L, et al. AGTR2, One Possible Novel Key Gene for the Entry of SARS-CoV-2 into Human Cells. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinforma*. 2021;18(4):1230–3.

14. Summary of naturally acquired SARS-CoV-2 infections in domestic animals and farmed, captive, or free-ranging wildlife species [Internet]. American Veterinary Medical Association. 2021 [cited 2021 Sep 15]. Available from: <https://www.avma.org/resources-tools/animal-health-and-welfare/covid-19/depth-summary-reports-naturally-acquired-sars-cov-2>
15. Younes S, Younes N, Shurrab F, Nasrallah G. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 natural animal reservoirs and experimental models: systematic review. *Reviews in Medical Virology*. 2020;31(4).
16. Li Y, Wang H, Tang X, et al. SARS-CoV-2 and three related coronaviruses utilize multiple ACE2 orthologs and are potently blocked by an improved ACE2-Ig. *J Virol*. 2020;JVI.01283–20.
17. Lam SD, Bordin N, Waman VP, Scholes HM, Ashford P, Sen N, et al. SARS-CoV-2 spike protein predicted to form complexes with host receptor protein orthologues from a broad range of mammals. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–14.
18. Mathavarajah, S.; Stoddart, A.K.; Gagnon, G.A.; Dellaire, G. Pandemic danger to the deep: The risk of marine mammals contracting SARS-CoV-2 from wastewater. *Sci. Total Environ*. 2021, 760, 143346.
19. Piplani S, Singh PK, Winkler DA, Petrovsky N. In silico comparison of SARS-CoV-2 spike protein-ACE2 binding affinities across species and implications for virus origin. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–13.
20. Mordecai GJ, Hewson I. Coronaviruses in the Sea. *Front Microbiol*. 2020;11(July):1–6.



21. Núñez-Nogueira G, Valentino-Álvarez JA, Granados-Berber AA, Ramírez-Ayala E, Zepeda-González FA, Tintos-Gómez A. Aquatic Biota Is Not Exempt from Coronavirus Infections: An Overview. *Water*. 2021;13(16):2215.
22. Elizabeth Alberts. Can whales and dolphins catch COVID-19 from wastewater? It's murky [Internet]. *Mongabay Environmental News*. 2020 [cited 2021 Oct 24]. Available from: <https://news.mongabay.com/2020/12/could-whales-and-dolphins-get-covid-19-from-wastewater-possibly-study-says/>
23. Morbillivirus infection in bottlenose dolphins. *AccessScience*. 2014. Available from: <https://www.accessscience.com/content/BR0904141>
24. Guo W, Cao Y, Kong X, Kong S, Xu T. Potential threat of SARS-CoV-2 in coastal waters. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2021;220:112409.
25. Sala-Comorera L, Reynolds LJ, Martin NA, O'Sullivan JJ, Meijer WG, Fletcher NF. Decay of infectious SARS-CoV-2 and surrogates in aquatic environments. *Water Res* [Internet]. 2021;201:117090.
26. de Oliveira LC, Torres-Franco AF, Lopes BC, Santos BSÁ da S, Costa EA, Costa MS, et al. Viability of SARS-CoV-2 in river water and wastewater at different temperatures and solids content. *Water Res* [Internet]. 2021;195:117002.
27. Reyes JC. Ballenas, delfines y otros cetáceos de Perú. Una fuente de información. 2009;(June):1–159.
28. Arias-Schreiber M. Informe sobre el estado de conocimiento y conservación de los mamíferos marinos en el Perú. Vol. 38, Informe Progresivo IMARPE. 1996. p. 3–30.

29. The International Union for Conservation of Nature [Internet]. IUCN Red List of Threatened Species. 2021 [cited 28 October 2021]. Available from: <https://www.iucnredlist.org/es>
30. Hancock J, Rouse R, Stone E, Greenhough A. Interacting Proteins, Polymorphisms and the Susceptibility of Animals to SARS-CoV-2. *Animals*. 2021;11(3):797.
31. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B et al. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2012;1824(1):68-88.
32. de Aberasturi A, Calvo A. TMPRSS4: an emerging potential therapeutic target in cancer. *British Journal of Cancer*. 2014;112(1):4-8.

## Anexos

### ANEXO 1

<b>Mamíferos acuáticos presentes en Perú que poseen secuencias de todas las proteínas del estudio o genoma ensamblado</b>		
<b>Área geográfica</b>	<b>Especie</b>	<b>Fuente</b>
Agua salada	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Uniprot
	<i>Tursiops truncatus</i>	Uniprot
	<i>Physeter macrocephalus</i>	Uniprot
	<i>Globicephala melas</i>	NCBI (protein)
	<i>Orcinus orca</i>	NCBI (protein)
	<i>Balaenoptera musculus</i>	NCBI (protein)

	<i>Balaenoptera physalus</i>	NCBI (ensamblado)
	<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	NCBI (ensamblado)
	<i>Megaptera novaeangliae</i>	NCBI (ensamblado)
	<i>Kogia breviceps</i>	NCBI (ensamblado)
	<i>Ziphius cavirostris</i>	NCBI (ensamblado)
	<i>Balaenoptera edeni</i>	<a href="https://www.dnazoo.org/asssemblies/Balaenoptera_edeni">https://www.dnazoo.org/asssemblies/Balaenoptera_edeni</a>
	<i>Grampus griseus</i>	<a href="https://www.dnazoo.org/asssemblies/Grampus_griseus">https://www.dnazoo.org/asssemblies/Grampus_griseus</a>
	<i>Peponocephala electra</i>	<a href="https://www.dnazoo.org/asssemblies/Peponocephala_electra">https://www.dnazoo.org/asssemblies/Peponocephala_electra</a>
	<i>Stenella attenuata</i>	<a href="https://www.dnazoo.org/asssemblies/Stenella_attenuata">https://www.dnazoo.org/asssemblies/Stenella_attenuata</a>
	<i>Stenella longirostris</i>	<a href="https://www.dnazoo.org/asssemblies/Stenella_longirostris_orientalis">https://www.dnazoo.org/asssemblies/Stenella_longirostris_orientalis</a>
	<i>Steno bredanensis</i>	<a href="https://www.dnazoo.org/asssemblies/Steno_bredanensis">https://www.dnazoo.org/asssemblies/Steno_bredanensis</a>
	<i>Mesoplodon densirostris</i>	<a href="https://www.dnazoo.org/asssemblies/Mesoplodon_densirostris">https://www.dnazoo.org/asssemblies/Mesoplodon_densirostris</a>
Agua dulce	<i>Pteronura brasiliensis</i>	NCBI (ensamblado)
	<i>Inia geoffrensis</i>	NCBI (ensamblado)