



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

**Especificidad de los anticuerpos IgG de alpacas contra  
antígenos de la proteína S de las variantes alfa, beta y  
delta de SARS-CoV-2 y coronavirus de alpaca**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

**AUTOR**

María Samantha RODRÍGUEZ HUAMÁN

**ASESOR**

Mg. Alberto Gustavo MANCHEGO SAYÁN

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Rodríguez M. Especificidad de los anticuerpos IgG de alpacas contra antígenos de la proteína S de las variantes alfa, beta y delta de SARS-CoV-2 y coronavirus de alpaca [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2024.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	María Samantha Rodríguez Huamán
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	74281240
URL de ORCID	-----
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Alberto Gustavo Manchego Sayán
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	15619652
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-8199-0418">https://orcid.org/0000-0002-8199-0418</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Luis Antonio Gómez Puerta
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10810335
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Eloy Anibal Gonzales Gustavson
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41630020
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Juan Anderson More Bayona
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43316819

<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	Microbiología y parasitología veterinaria
Grupo de investigación	GIVIVET
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt). Número de contrato 172-2020.
Ubicación geográfica de la investigación	FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Av. Circunvalación 28, San Borja 15021 W296+8W San Borja
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2022 - 2023
URL de disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01</a>



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA

En el Aula posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **viernes 24 de mayo de 2024**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0052-EPMV/FMV-2024** integrado por los siguientes profesores:

MV. Mg. GÓMEZ PUERTA LUIS ANTONIO	Presidente del Jurado
MV. Mg. MANCHEGO SAYÁN ALBERTO GUSTAVO	Asesor de la Tesis
MV. Dr. GONZALES GUSTAVSON ELOY ANIBAL	Miembro del Jurado
MV. PhD. MORE BAYONA JUAN ANDERSON	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Doña: **RODRÍGUEZ HUAMÁN MARÍA SAMANTHA**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

**“ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS IgG DE ALPACAS CONTRA ANTÍGENOS DE LA PROTEÍNA S DE LAS VARIANTES ALFA, BETA Y DELTA DE SARS-CoV-2 Y CORONAVIRUS DE ALPACA”**,

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **diecisiete (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las 13:40 horas, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:



Firmado digitalmente por GOMEZ  
PUERTA Luis Antonio FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 05.07.2024 08:51:49 -05:00

.....  
Gómez Puerta Luis Antonio: MV. Mg. Prof. Auxiliar T.C



Firmado digitalmente por  
MANCHEGO SAYAN Alberto Gustavo  
FAU 20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 05.07.2024 08:18:25 -05:00

.....  
Manchego Sayán Alberto Gustavo: MV. Mg Prof. Principal DE

.....  
Gonzales Gustavson Eloy Ambal MV. Dr. Prof. Auxiliar TC



Firmado digitalmente por MORE  
BAYONA Juan Anderson FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 04.07.2024 17:22:36 -05:00

.....  
More Bayona Juan Anderson: MV. PhD Prof. Asociado DE

|||



## CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Alberto Gustavo Manchego Sayán en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Directoral N°0156-EPMV/FMV-2022 de la tesis informe de investigación, cuyo título es **“Especificidad de los anticuerpos IgG de alpacas contra antígenos de la proteína S de las variantes alfa, beta y delta de SARS-CoV-2 y coronavirus de alpaca”**, presentado por la bachiller **Rodríguez Huamán, María Samantha** para optar el título de Médico Veterinario CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 16% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título correspondiente.



DNI: 15619652

---

Dr. Alberto Gustavo Manchego Sayán

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis principalmente a mis amados padres María Teresa y Agustín, por su apoyo en mi educación y cariño incondicional desde siempre.

A mi gatito Tylon por su leal compañía, sobre todo en mis amanecidas de estudio y por ser el motivo de mis sonrisas en mis días difíciles.

A mis más cercanas amigas de la universidad: Taiz y Maritza, por estar para mí con sus consejos y ocurrencias. La vida universitaria fue llevadera gracias a ustedes.

## **Agradecimientos**

Mi primer agradecimiento sincero a mi asesor Alberto Manchego Sayan, por haber confiado en mí para el desarrollo de este trabajo, por hacerme sentir parte del equipo de investigación y por su amistad brindada.

Un especial agradecimiento al Dr. Miguel Rojas, por su disposición y paciencia al entrenarme en las técnicas de laboratorio necesarias en la elaboración de este proyecto, también por sus consejos que siempre llevaré presentes.

A mi compañera de laboratorio MV Noriko Oviedo, por su apoyo directo en el desarrollo de la parte experimental de esta tesis y por brindarme su amistad.

Al Dr Denis Navarro por su apoyo en laboratorio y solventar mis dudas aun estando fuera de horario laboral.

A Luis por su comprensión y apoyo tecnológico durante la redacción de este trabajo y no hacerme perder la visión a futuro.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM y al FONDECYT – CONCYTEC por la subvención del trabajo de tesis en el marco del proyecto “Sistema de detección rápido de SARS-CoV-2 en superficies: Una potencial herramienta de prevención para espacios públicos” - número de contrato 172-2020.

# INDICE

<b>Dedicatoria.....</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>iii</b>
<b>Índice.....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE CUADROS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LSITA DE ANEXOS.....</b>	<b>xii</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Coronavirus.....	3
2.1.1 Taxonomía y evolución.....	3
2.1.2 Características generales.....	5
2.1.2.1 Proteínas no estructurales.....	6
2.1.2.2 Proteínas estructurales.....	8
2.1.3 Coronavirus en mamíferos domésticos.....	9
2.2 Virus del SARS-CoV-2.....	10
2.2.1 Origen.....	11
2.2.2 Características generales.....	12
2.2.3 Mecanismo de síntesis de ARN.....	14
2.2.4 Variantes del virus SARS-CoV-2 y sus características .....	16
2.3 Respuesta inmune humana frente al SARS-CoV-2 .....	18
2.3.1 Sistema inmune innato.....	19
2.3.2 Sistema inmune adaptativo.....	20
2.4 Anticuerpos de alpaca.....	22
2.4.1 Características Generales.....	22
2.4.2 Respuesta contra SARS-CoV-2.....	24
<b>III. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1 Lugar y tiempo de ejecución.....	26
3.2 Descripción del material experimental.....	26
3.2.1 Criterios de muestreo.....	27
3.2.2 Consideraciones éticas.....	27
3.3 Diseño experimental.....	28
3.3.1 Selección de alpacas a inmunizar.....	28
3.3.1.1 Examen clínico.....	28

3.3.1.2	Análisis molecular para la detección de coronavirus de alpaca.....	28
3.3.1.2.1	Procesamiento de las muestras fecales...	28
3.3.1.2.2	Extracción de ARN.....	29
3.3.1.2.3	Producción de ADN complementario (ADNc)	29
3.3.1.2.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
3.3.1.2.5	Electroforesis en gel de agarosa.....	32
3.3.1.3	Análisis serológico para la detección de anticuerpos contra coronavirus de alpaca.....	32
3.3.2	Inmunógenos.....	33
3.3.2.1	Preparación de inmunógenos de cepas aisladas....	33
3.3.2.2	Inmunógenos obtenidos de laboratorios comerciales	36
3.3.3	Inmunización de alpacas.....	37
3.3.4	Obtención de sueros.....	37
3.3.5	Detección de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 mediante la prueba de neutralización viral.....	38
3.3.6	Análisis de la información.....	39
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
4.1	Detección de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2.....	40
4.2	Análisis estadístico .....	42
<b>V.</b>	<b>DISCUSION.....</b>	<b>44</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>51</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>69</b>

## RESUMEN

Los virus de la familia *Coronaviridae* ocasionan enfermedades tanto en humanos como en animales vertebrados siendo responsables de infecciones entéricas y respiratorias. La reciente pandemia causada por el SARS-CoV-2, un coronavirus perteneciente al género *Betacoronavirus*, tiene un impacto global sin precedentes en la salud pública, la economía y la sociedad en su conjunto; por lo tanto, comprender la biología del virus y la respuesta inmune contra este virus es esencial para desarrollar estrategias efectivas de diagnóstico, prevención y tratamiento de la enfermedad. La proteína espiga (S), ligando viral que se une al receptor celular de membrana ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2), es la principal proteína inmunogénica en inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. Se han reportado mutaciones a nivel molecular en la proteína S, que generan la emergencia de nuevas variantes con mayor capacidad de infectividad y mayor habilidad para evadir la respuesta del sistema inmune del huésped. El objetivo del presente trabajo fue determinar las diferencias de las respuestas de neutralización viral de los anticuerpos IgG de alpacas inoculadas con la proteína S de las variantes original, alfa, beta y delta del SARS-CoV-2. Además, determinar si existe inmunidad cruzada entre el coronavirus de alpaca y el SARS-CoV-2. Para esto se seleccionaron 35 alpacas, clínicamente sanas y con diagnóstico negativo a coronavirus mediante la prueba molecular RT-PCR y la prueba serológica de neutralización viral, agrupadas en 7 grupos de 5 animales para ser inmunizadas contra la proteína S de las variantes original, alfa, beta y delta del SARS-CoV-2, el virus completo del SARS-CoV-2, el coronavirus completo de alpaca y suero fisiológico como control. Tras obtener los sueros a partir de la sangre de cada alpaca, luego de 30 días desde la inmunización, estos fueron enfrentados en la prueba de neutralización viral contra el virus completo del SARS-CoV-2, con el fin de cuantificar solo a los anticuerpos neutralizantes de las alpacas inmunizadas. Como resultado se obtuvo diferentes títulos de anticuerpos para cada antígeno: todas las alpacas inmunizadas con la proteína S de la variante alfa y con el virus SARS-CoV-2 completo demostraron alto título de anticuerpos ( $\geq 1/256$ ) y se determinó que no había diferencia estadística entre ambas respuestas ( $p > 0.05$ ). En cuanto a las respuestas de anticuerpos de las proteínas S de las variantes beta, delta y original frente al SARS-CoV-2, todas las alpacas desarrollaron anticuerpos neutralizantes a excepción de una alpaca inmunizada con la proteína S de la variante delta (título  $< 1/2$ ). Tras comparar de forma estadística las respuestas de neutralización de las proteínas S de las variantes original, alfa, beta y delta, se demostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre todas ellas a excepción entre la respuesta de la proteína S de la variante delta y la original. El inmunógeno de coronavirus de alpaca no indujo ninguna respuesta de anticuerpos neutralizantes y su resultado no tuvo diferencia significativa con lo obtenido a la inmunización

con suero fisiológico ( $p>0.05$ ). Nuestro trabajo concuerda con estudios realizados que comparan la respuesta inmunológica entre variantes, indicando presencia de inmunidad cruzada con distintos niveles de producción de anticuerpos; sin embargo, no se observa esta relación entre el SARS-CoV-2 y el coronavirus de alpaca. Se concluye que la inmunización contra una variante en particular genera también cierto grado de protección contra las otras variantes al conservar aún una gran cantidad de epítomos en común.

***Palabras clave:*** coronavirus, proteína S, SARS-CoV-2, anticuerpos de alpaca, inmunidad cruzada

## ABSTRACT

Viruses of the Coronaviridae family cause diseases in both humans and vertebrate animals, being responsible for enteric and respiratory infections. The recent pandemic caused by SARS-CoV-2, a coronavirus belonging to the Betacoronavirus genus, has an unprecedented global impact on public health, the economy, and society as a whole; therefore, understanding the biology of the virus and the immune response against this virus is essential to develop effective strategies for diagnosis, prevention, and treatment of the disease. The spike protein (S), a viral ligand that binds to the cellular membrane receptor ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2), is the main immunogenic protein in inducing the production of neutralizing antibodies. Molecular-level mutations have been reported in the S protein, which generate the emergence of new variants with greater infectivity capacity and greater ability to evade the host's immune system response. The objective of this work was to determine the differences in the viral neutralization responses of IgG antibodies from alpacas inoculated with the S protein of the original, alpha, beta and delta variants of SARS-CoV-2. In addition, to determine whether there is cross-immunity between alpaca coronavirus and SARS-CoV-2. The objective of this study is to determine the differences in viral neutralization responses of IgG antibodies from alpacas inoculated with the S protein from the original, alpha, beta, and delta variants of SARS-CoV-2. Additionally, to determine if there is cross-immunity between the alpaca coronavirus and SARS-CoV-2. For this, 35 clinically healthy alpacas, with negative coronavirus diagnosis by RT-PCR molecular test and viral neutralization serological test, were selected and grouped into 7 groups of 5 animals to be immunized against the S protein of the original, alpha, beta, and delta variants of SARS-CoV-2, the complete SARS-CoV-2 virus, the complete alpaca coronavirus, and physiological serum as control. After obtaining sera from the blood of each alpaca, 30 days post-immunization, they were tested in the viral neutralization assay against the complete SARS-CoV-2 virus, in order to quantify only the neutralizing antibodies of the immunized alpacas. As a result, different antibody titers were obtained for each antigen: all alpacas immunized with the S protein of the alpha variant and with the complete SARS-CoV-2 virus showed high antibody titers ( $\geq 1/256$ ) and it was determined that there was no statistical difference between both responses ( $p > 0.05$ ). Regarding the antibody responses to the S proteins of the beta, delta, and original variants against SARS-CoV-2, all alpacas developed neutralizing antibodies except for one alpaca immunized with the S protein of the delta variant (titer  $< 1/2$ ). After statistically comparing the neutralization responses of the S proteins from the original, alpha, beta, and delta variants, a significant difference ( $p < 0.05$ ) was demonstrated between all of them except between the response of the S protein from the delta variant and the original. The alpaca coronavirus immunogen did not induce any neutralizing antibody response, and its result did not differ significantly from that obtained with physiological

serum ( $p>0.05$ ). Our work agrees with studies comparing immune responses between variants, indicating cross-immunity with different levels of antibody production; however, this relationship is not observed between SARS-CoV-2 and the alpaca coronavirus. It is concluded that immunization against a particular variant also generates a certain degree of protection against other variants by still retaining a large number of common epitopes.

**Keywords:** coronavirus, S protein, SARS-CoV-2, alpaca antibodies, cross-immunity

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo de la evolución de los coronavirus (Woo <i>et al.</i> , 2009) .....	4
<b>Figura 2.</b> Estructura genómica de cuatro géneros de coronavirus. (Chen <i>et al.</i> , 2020) ...	6
<b>Figura 3.</b> Análisis filogenético de los genomas de SARS-CoV-2 y otros virus representativos de género <i>Betacoronavirus</i> (Lu <i>et al.</i> , 2020).....	11
<b>Figura 4.</b> a) Estructura general del virus SARS-CoV-2 y sus proteínas estructurales. b) Organización genómica del SARS-CoV-2. (Zhou H <i>et al.</i> , 2020) .....	13
<b>Figura 5.</b> Esquema de la estructura completa de la proteína S. (Casalino <i>et al.</i> , 2020) ...	14
<b>Figura 6.</b> Esquema del mecanismo de replicación del SARS-CoV-2. (Magazine <i>et al.</i> , 2023).....	16
<b>Figura 7.</b> Esquema de la respuesta inmune contra SARS-CoV-2. (Prompetchara <i>et al.</i> , 2020) .....	19
<b>Figura 8.</b> Estructura de las subclases de la inmunoglobulina G (IgG) de camello (Hussen y Schuberth, 2021) .....	23
<b>Figura 9.</b> Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos amplificados mostrando los productos amplificados del RT-PCR BetaCoV, gen ORF1b (227pb).....	32
<b>Figura 10.</b> Alineamiento múltiple de las secuencias nucleótidos obtenidas del SARS-CoV-2 mediante el programa de BLAST.....	34
<b>Figura 11.</b> Esquema del protocolo de cuantificación de proteínas utilizando Qubit Protein Assay.....	35
<b>Figura 12.</b> Gráfico de dispersión de las respuestas de títulos de anticuerpos por cada antígeno inoculado realizado en R.....	41

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Principales variantes del SARS-CoV-2 con sus características más destacadas (Abeledo-Pérez y Moreno, 2021). .....	17
<b>Cuadro 2.</b> Distribución de los grupos y números de alpacas experimentalmente inmunizadas.....	27
<b>Cuadro 3.</b> Componentes y cantidades del Master Mix para la transcripción reversa (RT)	30
<b>Cuadro 4.</b> Condiciones de la PCR para la detección de Panbetacoronavirus.....	31
<b>Cuadro 5.</b> Oligonucleótidos utilizados en la reacción de RT- PCR para la detección de Panbetacoronavirus.....	31
<b>Cuadro 6.</b> Características de los inmunógenos obtenidos de laboratorios comerciales...	36
<b>Cuadro 7.</b> Esquema de inmunización de las alpacas.....	37
<b>Cuadro 8.</b> Número de alpacas distribuido en su resultado de título de anticuerpos por cada antígeno inoculado.....	41
<b>Cuadro 9.</b> Diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre los resultados de anticuerpos por cada antígeno indicado por superíndices <sup>a,b,c,d,e</sup> .....	42

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo1.</b> Prueba de Kruskall Walis y <i>post hoc</i> en R .....	68
--	----

## ABREVIATURAS

- CDR:** en inglés, Región Determinante de la Complementariedad
- CoV:** coronavirus
- ECA2:** Enzima convertidora de angiotensina 2
- Hcabs:** del inglés, Heavy Chain Antibodies
- Nsp:** Proteína no estructural
- ORF:** Open Reading Frame, marco de lectura abierto
- PAMPS:** Patrones moleculares asociados a patógenos
- RTC:** Complejo replicasa-transcriptasa
- S:** spike o espiga
- TLR:** Receptores tipo toll+
- DI50CC:** Dosis infectiva 50 en cultivo celular
- ACoV:** Coronavirus de alpaca
- BCoV:** Coronavirus bovino
- PDCoV:** Deltacoronavirus porcino
- sgARN:** ARN subgenómico
- nsps:** proteínas no estructurales
- DMV:** Vesícula doble membrana
- PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- ADNc:** ADN complementario
- ADE:** Del inglés (Antibody-Dependent Enhancement), mejora dependiente de anticuerpos.
- IFN:** Interferón
- PRR:** Respuesta de Patrones de Reconocimiento
- NK:** Células Natural Killer
- RdRp:** ARN polimerasa dependiente de ARN
- RBD:** Del inglés (Receptor Binding Domain), dominio receptor-obligatorio
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- FAb:** Fragmento de unión a antígeno
- BiP:** Del inglés (Binding immunoglobulin Protein), proteína chaperona de unión a cadena pesada
- PEDV:** virus de la Diarrea Epidémica Porcina

## I. INTRODUCCIÓN

La pandemia del COVID-19 producido por el SARS-CoV-2, ha generado la atención en la respuesta inmune de los mamíferos frente al virus emergente para su prevención. Se ha determinado que la proteína S del virus es altamente inmunogénica, pero aún se desconoce cuáles son los epítomos que inducen a producir anticuerpos neutralizantes que eviten la infección del virus en los animales susceptibles. En diversos estudios se han producido anticuerpos monoclonales con diferentes grados de neutralización viral, lo que indica que existen muchos epítomos que inducen a producir anticuerpos neutralizantes, y que podrían ser comunes no solamente al SARS-CoV-2 sino también a otros coronavirus que afectan a distintos animales domésticos y humanos de los ya conocidos coronavirus de la gripe común (Ravichandran *et al.*, 2020; Kyriakidis *et al.*, 2021).

También se ha determinado que los anticuerpos de camélidos sudamericanos producidos contra el SARS-CoV-2 son altamente específicos y aun a ser considerados en estudios para analizar su posible terapia en infecciones graves de COVID-19. Estudios recientes realizados en otros países produjeron nanoanticuerpos a partir de los anticuerpos de cadena pesada (Hcab) de alpacas. Estos nanoanticuerpos fueron enfrentados al antígeno S del SARS-CoV-2 logrando unirse al dominio receptor-obligatorio (RBD por sus siglas en inglés Receptor Binding Domain) de la región S1, bloqueando así su unión a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) y logrando neutralizar al virus (Chow *et al.*, 2019; Huo *et al.*, 2020).

Se especula que los anticuerpos producidos por infecciones o enfrentamiento a diversos coronavirus pueden inducir alguna protección para prevenir la infección o reducir la severidad de la enfermedad (COVID-19), además de que el virus tiene la capacidad de producir mutaciones en la proteína S e inducir variantes genómicas y que se debe determinar su capacidad de reacción

cruzada inmune entre estas variantes. Por lo que es necesario averiguar más sobre la especificidad y la posible reacción cruzada entre los anticuerpos contra SARS-CoV-2 de diversas variantes del virus y del coronavirus aislado de alpacas.

El objetivo del presente trabajo es determinar las diferencias de las respuestas de neutralización viral de los anticuerpos IgG de alpacas inoculadas con la proteína S de las variantes original, alfa, beta y delta del SARS-CoV-2. Además, determinar si existe inmunidad cruzada entre el coronavirus de alpaca y el SARS-CoV-2.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Coronavirus

Los coronavirus (CoVs) son causantes de enfermedades en humanos y animales vertebrados, afectando a los sistemas respiratorio, gastrointestinal, hepático y nervioso central (Chen *et al.*, 2020).

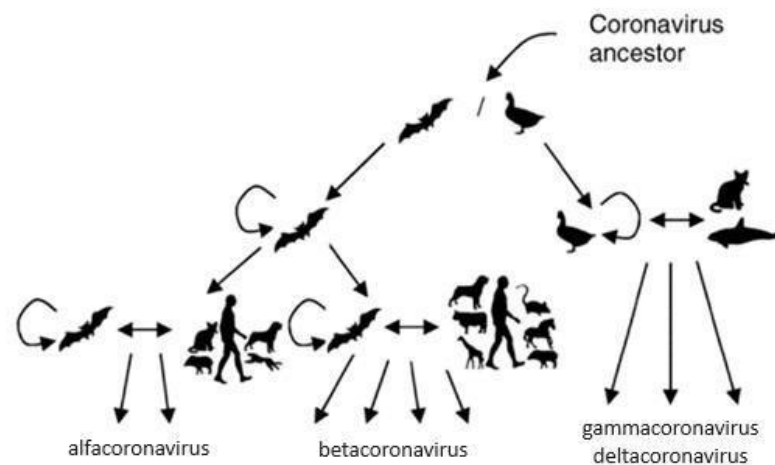
#### 2.1.1 Taxonomía y evolución

De acuerdo con su clasificación taxonómica, los coronavirus se sitúan dentro del orden de los *Nidovirales*, suborden *Cornidovirineae*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Orthocoronavirinae*, de la cual se subdividen cuatro géneros:

- **Alfacoronavirus ( $\alpha$ ):** Infectan principalmente a humanos y animales domésticos. Como ejemplos incluye al HCoV-229E (Coronavirus humano 229E) causante de infecciones respiratorias leves en humanos; al coronavirus felino causante de la peritonitis infecciosa felina y al virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV) que infecta a cerdos (Ge *et al.*, 2017).
- **Betacoronavirus ( $\beta$ ):** Infectan humanos, murciélagos y animales domésticos. Entre los más conocidos tenemos al SARS-CoV (Síndrome Respiratorio Agudo Severo) que causa enfermedad respiratoria grave en humanos, el MERS-CoV (Síndrome Respiratorio de Oriente Medio) y al SARS-CoV-2 (COVID-19) causante de la reciente pandemia mundial (Cui *et al.*, 2019).
- **Gammacoronavirus ( $\gamma$ ):** Infectan principalmente a aves, como el virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) (Cavanagh, 2007).

- **Deltacoronavirus ( $\delta$ ):** También infectan principalmente a aves, aunque además se ha detectado en murciélagos y algunos mamíferos como el deltacoronavirus porcino (PDCoV) (Pérez-Rivera *et al.*, 2019).

El análisis evolutivo de los coronavirus ha demostrado que tanto los alfacoronavirus como los betacoronavirus se originan en murciélagos y roedores, mientras que gammacoronavirus y deltacoronavirus provienen de especies de aves. De acuerdo con las bases de datos de secuencias actuales, todos los coronavirus humanos tienen origen animal: el SARS-CoV, el MERS-CoV, el HCoV-NL63 y el HCoV-229E se originaron en los murciélagos; mientras el HCoV-OC43 y HKU1 probablemente se originaron en roedores (Su *et al.*, 2016; Saberiyan *et al.*, 2022).



**Figura 1.** Modelo de la evolución de los coronavirus. Se postula que los coronavirus en murciélagos son el reservorio genético de los coronavirus de los alfacoronavirus y betacoronavirus, mientras que los coronavirus en aves son el reservorio genético de los gammacoronavirus y deltacoronavirus (Woo *et al.*, 2009).

Una vez transmitidos, los CoVs pueden adaptarse al nuevo huésped debido a su alta frecuencia de recombinación, su genoma ARN permite una plasticidad adicional en su modificación mediante mutaciones y recombinaciones, aumentando la probabilidad de que surjan variabilidad intraespecies, "salto de huésped" entre especies y nuevos CoVs en las condiciones adecuadas. La creación de conjuntos de ARN subgenómicos (sgARN) durante la replicación del virus pueden aumentar la tasa de recombinación homóloga entre genes estrechamente relacionados de diferentes linajes de CoVs; sin embargo, el mecanismo exacto de recombinación sigue siendo incierto, los puntos de cruce de los genes recombinantes entre dos cepas o genotipos virales distintos parecen ser aleatorios (Woo *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2016).

Los animales domésticos pueden desempeñar funciones importantes como huéspedes intermediarios que permiten la transmisión de virus desde los huéspedes naturales a los humanos.

Además, las infecciones causadas por coronavirus propagados por murciélagos o animales estrechamente relacionados pueden afectar también a los animales domésticos. Por ejemplo, se han encontrado secuencias genómicas sorprendentemente similares al PEDV, que afecta a cerdos, en murciélagos (Cui *et al.*, 2019).

### 2.1.2 Características generales

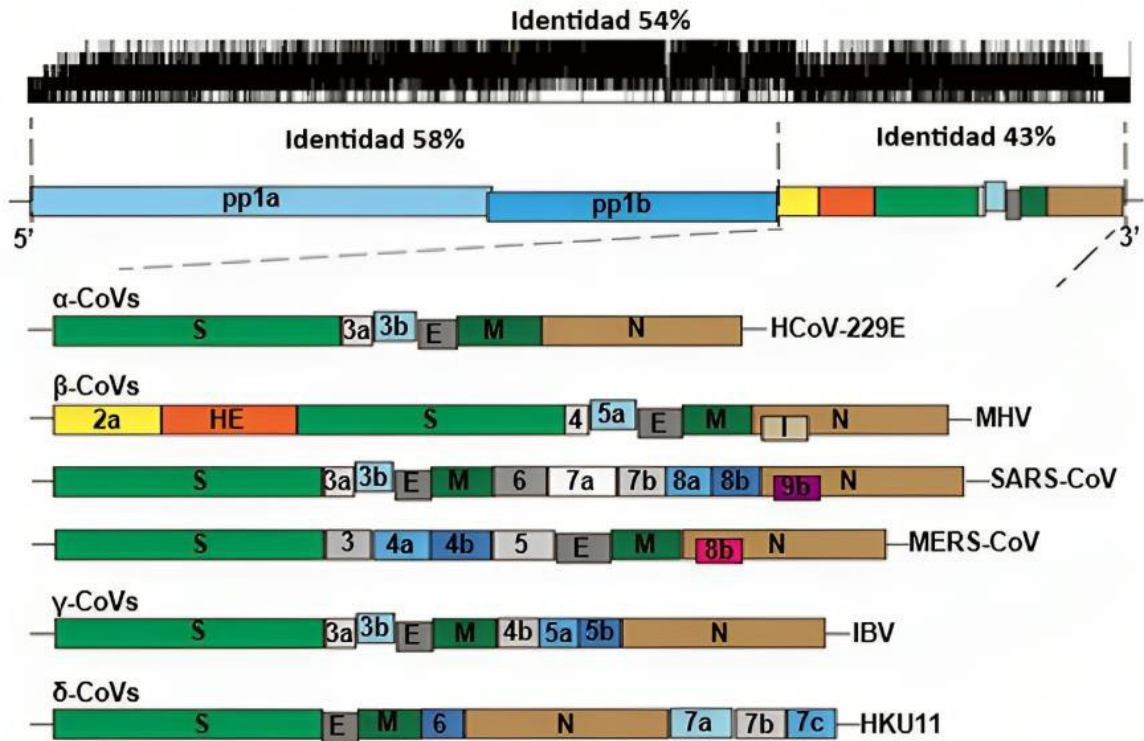
El virión presenta una morfología esférica, con un diámetro que varía entre 80 a 220nm, Su estructura se compone de una nucleocápside que protege al genoma viral y una envoltura externa. La superficie de estos viriones está decorada con unas proyecciones en forma de púas, que al ser observadas bajo microscopía electrónica confieren una apariencia similar a una corona y es por esta característica que se les denomina “coronavirus”. Estas proyecciones que pueden medir entre 17 a 20 nm corresponden a trímeros de la glicoproteína S o proteína espiga, la cual se conserva en diversos grados en toda la familia *Coronaviridae* y desempeña un rol importante en la unión inicial y la fusión del virus con la célula huésped (Bosch *et al.*, 2003; Casalino *et al.*, 2020).

El genoma del coronavirus es el mayor genoma de ARN vírico conocido. Se trata de un ARN monocatenario de sentido positivo (+ARNss) de entre 26 y 32 kb de longitud. Se parece mucho al ARNm de la célula huésped porque tiene una cola poliadenilada poli-A en el extremo 3' y una tapa metilada en el extremo 5' (Livingston *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020).

Dos tercios del genoma del extremo 5' codifica las poliproteínas 1a y 1ab (pp1a/pp1ab) a partir de ORF1a y ORF1ab y que luego se traducen en proteínas no estructurales (nsps) necesarias para la síntesis del ARN, dentro de ellas a la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). El otro tercio de genoma del extremo 3' codifica las proteínas estructurales principales: S (spike o proteína espiga), M (membrana), E (envoltura) y N (nucleocápside). Además de estas proteínas principales, otros CoVs codifican proteínas estructurales y accesorias especiales, como la proteína HE (hemaglutinina esterasa), la proteína 3a/b y la proteína 4a/b (Nal *et al.*, 2005; Wrapp *et al.*, 2020).

Toda la síntesis del ARN se realiza dentro del citoplasma de la célula huésped. A partir de las proteínas no estructurales (nsps) se forma el complejo replicasa-transcriptasa (RTC) en vesículas doble membrana (DMV) previamente elaboradas en el retículo endoplásmico; el RTC sintetiza un conjunto anidado de ARN subgenómicos (sgRNA) mediante una transcripción discontinua y a partir de ellos se traducen todas las proteínas estructurales y accesorias de la partícula viral (Nieto-Torres *et al.*, 2014; Fehr y Perlman, 2015).

Según la Figura 2, la alineación de secuencias de los genomas de varios CoV revela un 58% de identidad en la región que codifica para proteínas no estructurales y un 43% de identidad en la región que codifica para proteínas estructurales, para un total de 54% de identidad en todo el genoma. Esto sugiere que los genes que codifican proteínas no estructurales están más conservados, mientras que los que codifican proteínas estructurales son más diversos y requieren adaptación a nuevos huéspedes (Chen *et al.*, 2020).



**Figura 2.** Estructura genómica de cuatro géneros de coronavirus. Pp1a y pp1b son las poliproteínas que se procesan en proteínas no estructurales. S, E, M y N indican las cuatro proteínas estructurales: espiga, envoltura, membrana y nucleocápside; HE: hemaglutinina-esterasa. Nombres de virus: HCoV, coronavirus humano; MHV, virus de la hepatitis murina; SARS-CoV, Síndrome Respiratorio Agudo Severo; MERS-CoV, Síndrome Respiratorio de Oriente Medio; IBV, virus de la bronquitis infecciosa; HKU, coronavirus identificados por la Universidad de Hong Kong. (Chen *et al.*, 2020).

### 2.1.2.1 Proteínas no estructurales

Ha sido reportado que la mayoría de las nsps, comprendidas entre la nsp1 y nsp16 tienen roles específicos en la replicación de los CoVs (Jin *et al.*, 2020).

La nsp1 actúa como inhibidor de la expresión génica del huésped al unirse a los ribosomas 40S para inactivar sus funciones de traducción e induce la degradación del ARNm; además antagoniza

la respuesta inmune innata mediante la inhibición de la señalización de los interferones (Huang *et al.*, 2011; Chaudhuri, 2020).

La nsp2 genera una alteración del entorno celular del huésped al unirse a las proteínas prohibitina 1 y prohibitina 2 (PHB1 y PHB2) las cuales son importantes para el desarrollo del ciclo celular, la apoptosis y la biogénesis mitocondrial (Cornillez-Ty *et al.*, 2009).

La nsp3 interviene provocando cambios en la proteína STAT-1 del huésped, involucrada en la señalización de interferones tipo I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) y tipo II (IFN- $\gamma$ ), lo que se postula como una posible causa de la tormenta de citoquinas (Claverie, 2020). En cuanto a la nsp4 es crucial para la organización y estabilidad de las estructuras de membrana doble (DMV), necesarias para la síntesis eficiente de ARN y la replicación viral. La nsp5, también conocida como proteasa quimiotripsina-like (3Clpro) o proteasa principal (Mpro), facilita el clivaje de polipéptidos para generar otras proteínas no estructurales. Mientras tanto, la nsp6 limita la expansión de los autofagosomas al hacerlos más pequeños, impidiendo su fusión con los lisosomas y preservando así la maquinaria viral. Además, colabora en la formación de las DMV junto con la nsp3 y nsp4, contribuyendo así al ciclo replicativo del virus (Gadlage *et al.*, 2010; Angelini *et al.*, 2013; Cottam *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2020)

El complejo hexadecamérico formado por nsp7 y nsp8 presenta un canal central con dimensiones y propiedades electrostáticas positivas ventajosas para la unión de ácidos nucleicos. Esto sugiere que la función del canal es dar procesividad a la ARN polimerasa dependiente de ARN, o nsp12 (Zhai *et al.*, 2005; te Velthuis *et al.*, 2012).

La nsp9 facilita la dimerización del ARN viral mediante mecanismos variados, lo que aumenta su unión al ácido nucleico y potencialmente estabiliza los ARN durante su síntesis, ofreciendo protección contra nucleasas (Zeng *et al.*, 2018). Por otro lado, la nsp10 actúa como una plataforma para las proteínas nsp14 y nsp16, ayudando a su unión al complejo de replicación y mejorando su actividad durante el proceso de replicación viral. Aunque la función precisa de la nsp11 aún no está esclarecida y se considera principalmente como un punto de escisión, la nsp12 es crucial ya que codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN, una enzima vital que controla directamente el proceso de síntesis del ARN viral. Esta enzima, en colaboración con los cofactores nsp7 y nsp8, optimiza su actividad, garantizando así la eficiencia del proceso de replicación viral ((Fang *et al.*, 2008; te Velthuis *et al.*, 2010; Bouvet *et al.*, 2014)

La nsp13 presenta actividad helicasa, puede desenrollar tanto ADN de doble cadena como ARN en una dirección de 5' a 3' utilizando la energía derivada de la hidrólisis del ATP (Jia *et al.*, 2019).

La nsp14 lleva a cabo tanto la actividad de exonucleasa (ExoN) usando de cofactor a la nsp10 como la actividad de metiltransferasa de guanina-N7 (N7-MTasa) desempeñando un papel en la corrección o reparación del ARN (Eckerle *et al.*, 2010; Bouvet *et al.*, 2012).

La nsp15 es una endorribonucleasa hexamérica específica de uridilato. Según análisis de productos de ARN separados por electroforesis en gel desnaturalizante, se ha informado que Nsp15 corta tanto en el 5' como en el 3' de la uridina, sin embargo, en un estudio realizado por Bhardwaj *et al.* se informa que la escisión es en el sitio 5' de la uridina. Además, se sabe que la afinidad de unión al ARN aumenta con el contenido del cofactor Mn<sup>2+</sup> (Ivanov *et al.*, 2004; Bhardwaj *et al.*, 2006).

La nsp16 es una 2'-O-metiltransferasa que solo se activa en presencia de su pareja activadora nsp10. Funciona disminuyendo las actividades de RIG-I (Retinoic Acid Inducible Gene I) y MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated Protein 5) los cuales son receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que juegan un papel en la detección y respuesta inmune frente a los virus de ARN (Decroly *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2019).

#### **2.1.2.2 Proteínas estructurales**

Las cuatro principales (S, M, E y N) son esenciales para el ensamblaje de nuevos viriones. La proteína S (proteína espiga o spike) se conserva en diversos grados dentro de la familia *Coronaviridae*; es una proteína de fusión clase I, sintetizada como una única cadena polipeptídica de 1273 aminoácidos que forman un complejo trimérico sobre la superficie viral, el cual se clasifica funcionalmente en dos subunidades distintas: S1 y S2, separadas por la furina y un sitio de clivaje reconocido por las proteasas de la célula huésped. La subunidad S1 contiene el dominio de unión al receptor (RBD por sus siglas en inglés) que interactúa con una proteína receptora de la célula huésped; y la subunidad S2 contiene la maquinaria de fusión de membranas (Delmas y Laude, 1990; Beniac *et al.*, 2006).

La proteína M (membrana) es la más abundante en la estructura viral siendo la principal responsable de dar forma a los viriones, ayudando a mantener su curvatura permitiendo la unión de la nucleocápside a la membrana (Neuman *et al.*, 2011).

La liberación de partículas víricas de la célula huésped se debe a los niveles ínfimos de la proteína E (envoltura). Las proteínas M y E controlan el ensamblaje viral y la formación de la envoltura (DeDiego *et al.*, 2007)

La proteína N (nucleocápside) se une de forma directa al material genético viral y lo provee de estabilidad, siendo necesaria para el empaquetamiento viral durante su ensamblaje (Hurst *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2014)

### 2.1.3 Coronavirus en mamíferos domésticos

En los caninos, el Coronavirus Canino (CCV) perteneciente al género *Alphacoronavirus*, subgénero *Tegacovirus*, ocasiona cuadros de enteritis tras infectar el epitelio del intestino delgado, resultando en descamación de las microvellosidades. La presentación clínica es variable, desde una enfermedad leve autolimitante donde los vómitos y diarreas cesan tras el octavo día, hasta un cuadro severo llegando a la deshidratación severa el cual se da mayormente en cachorros y está relacionado a coinfecciones (Decaro *et al.*, 2004; Buonavoglia *et al.*, 2006).

El coronavirus felino (FCoV), un tipo de coronavirus que se clasifica en dos tipos -tipo 1 y tipo 2-, afecta tanto a los felinos domésticos como a los salvajes. Perteneciente al género *Alphacoronavirus* y al subgénero *Tegacovirus*. El patotipo Coronavirus entérico felino (FEC) es la causa de la mayoría de las infecciones por FCoV, que son asintomáticas o pueden causar enteritis leve (Kipar *et al.*, 2010). La segunda pequeña fracción, causada por el patotipo del virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), desarrolla una sintomatología más grave porque también infecta a los monocitos, que son los responsables de transmitir el virus a otros sistemas (Pedersen *et al.*, 2009).

En bovinos, el coronavirus más común es el coronavirus bovino (BCoV), perteneciente al género *Betacoronavirus*, subgénero *Embecovirus*, especie *Betacoronavirus 1*. Infecta las vías respiratorias superiores e inferiores, como también al intestino, siendo responsable de cuadros clínicos como la Diarrea Neonatal y el Complejo Respiratorio Bovino (Saif, 2010; Luna *et al.*, 2015).

Los porcinos son afectados por coronavirus pertenecientes al género *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. Los pertenecientes al primer género son: el virus de la Gastroenteritis Transmisible Porcina (TGEV), el virus de la Diarrea Epidémica Porcina (PEDV) y el Coronavirus Respiratorio Porcino (PRCoV) (Wang *et al.*, 2019). Los dos primeros, tal como su nombre lo menciona afectan al sistema gastrointestinal causando diarreas acuosas y vómitos resultando en alta mortalidad sobretodo en lechones; en cambio el PRCoV afecta al tracto respiratorio y desarrolla una enfermedad leve e incluso de presentación subclínica. Dentro del género *Betacoronavirus* se encuentra el virus de la Encefalomiélitis Hemaglutinante Porcina

(PHEV) el cual afecta las vías respiratorias altas, bajas y también al intestino delgado, alcanzando al sistema nervioso central donde inicia la sintomatología nerviosa como convulsiones, opistótonos y parálisis. En el caso del Deltacoronavirus Porcino (PDCoV) genera también cuadros entéricos muy similares al PEDV, pero la enfermedad es menos severa (Pérez-Rivera *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020).

En el caso de los camélidos sudamericanos, la infección por coronavirus en alpacas y llamas fue identificada por primera vez en 1998. El análisis filogenético indica que el coronavirus de alpaca (ACoV) está cercanamente relacionado al coronavirus bovino, teniendo una similitud del 99.5%, sugiriendo un origen ancestral compartido entre ambos (Jin *et al.*, 2007). La enfermedad desarrolla una sintomatología entérica y en combinación con otros patógenos virales, bacterianos y parasitarios generan el complejo diarreico neonatal que resulta en alta mortalidad en las crías (Banks *et al.*, 2018). Un estudio realizado el año pasado en la provincia de Canchis, Cuzco, determinó mediante análisis molecular de muestras de heces tomadas de alpacas neonatas infectadas que el coronavirus fue el patógeno más comúnmente detectado en este complejo (87.5%) (Castilla *et al.*, 2023).

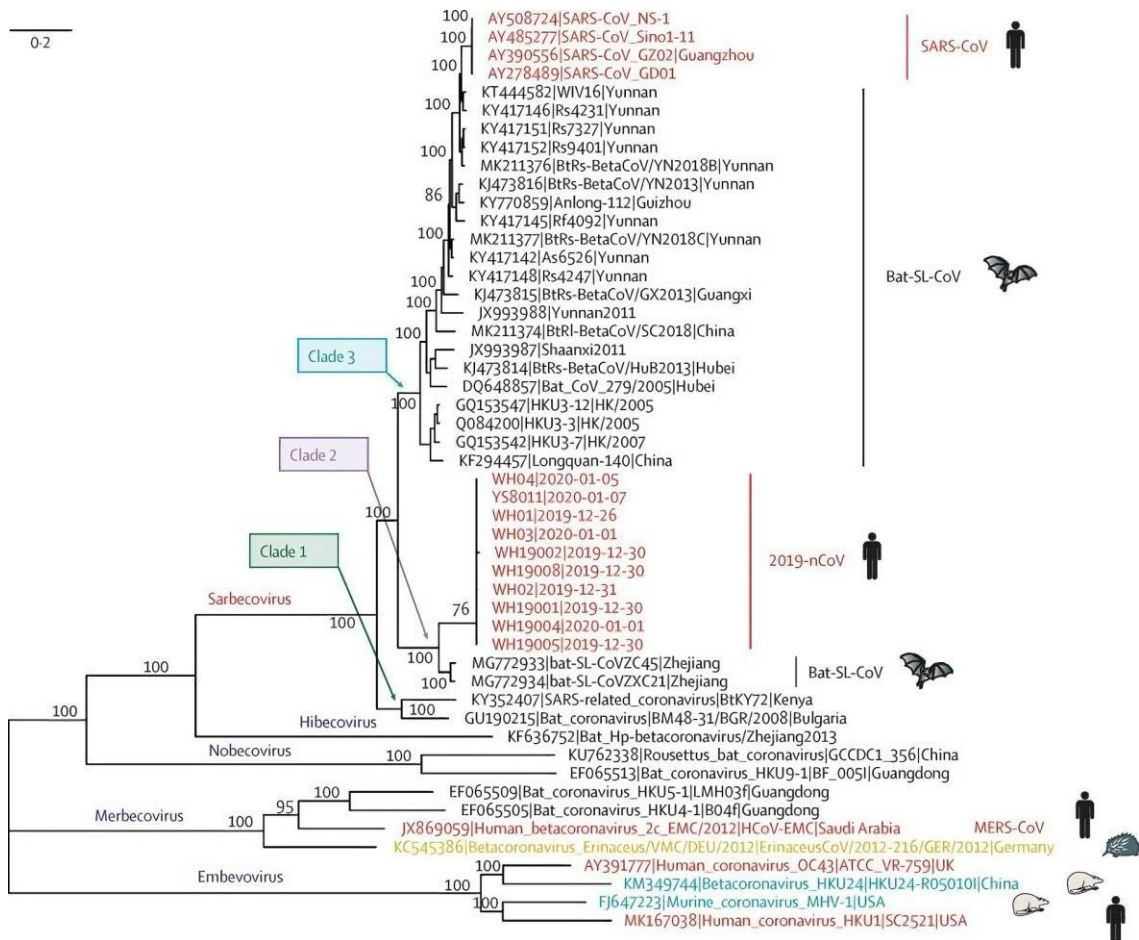
## **2.2 Virus del SARS-CoV-2**

En diciembre de 2019 se notificó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) un brote de neumonía no identificado en Wuhan, provincia china de Hubei. Al cabo de un mes, se aisló el virus de las células epiteliales del tracto respiratorio de los individuos afectados. Se secuenció su estructura genómica y se determinó que el agente pertenecía al género Betacoronavirus, de ahí la denominación SARS-CoV-2. Después se propagó rápidamente por China y desencadenó epidemias en otros muchos países, como Corea del Sur, Japón, Italia y Estados Unidos. La OMS reconoció la enfermedad por coronavirus causada por el SARS-CoV-2 2019 (COVID-19) como una emergencia de salud pública de importancia mundial el 31 de enero de 2020, y el 11 de marzo de 2020 se clasificó como pandemia (Wan *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020).

### **2.2.1 Origen**

Los estudios filogenéticos muestran que el SARS-CoV-2 se encuentra dentro del subgénero *Sarbecovirus* del género *Betacoronavirus*; y comparte una similitud del 88% con dos coronavirus derivados de murciélagos: Bat-SL-CoV ZC45 y el Bat-SL-CoV ZXC21; además se encuentra

lejanamente relacionado con el SARS-CoV-1 (alrededor del 79% de identidad) y el MERS-CoV (alrededor del 50% de identidad) (Chen *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2020).



**Figura 3.** Análisis filogenético de los genomas de SARS-CoV-2 y otros virus representativos de género Betacoronavirus (Lu *et al.*, 2020)

En un estudio realizado por Paraskevis *et al.*, se destaca que el SARS-CoV-2 comparte una afinidad genética del 96,3% con el coronavirus de murciélago denominado RaTG13, que fue identificado en un murciélago en Yunnan en el año 2013. Si bien varias investigaciones apuntan a que debido a su similitud genética el SARS-CoV-2 podría tener sus raíces en el coronavirus del murciélago, este no se reconoce como la fuente directa del SARS-CoV-2 (Paraskevis *et al.*, 2020).

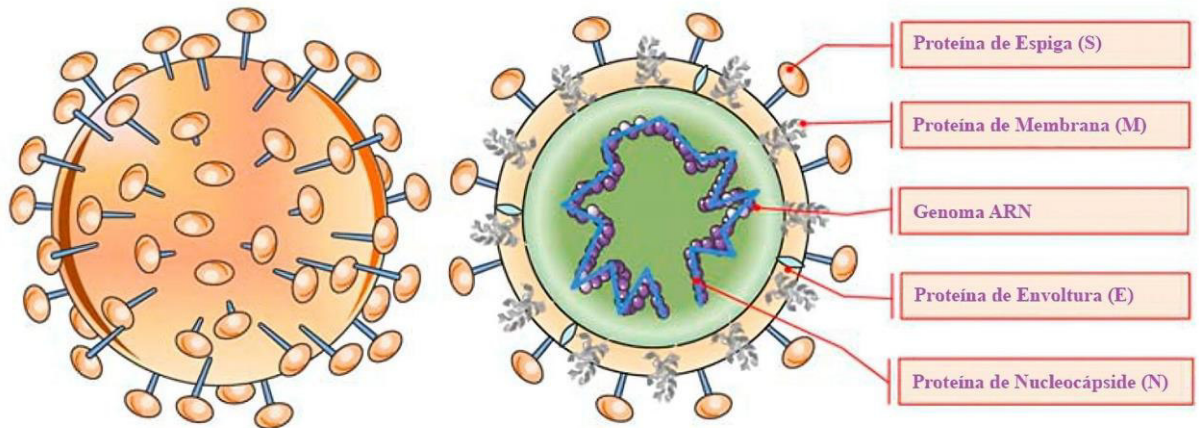
Según nuestra comprensión actual sobre la cadena de transmisión del SARS-CoV-2, se identifica al murciélago como el huésped reservorio, mientras que el pangolín es propuesto como huésped intermediario, el cual facilita la transmisión del virus hacia los humanos. Esto último se ve respaldado por los hallazgos de Xiao *et al.* quienes reportaron la presencia de un coronavirus (denominado pangolin-CoV) con semejanza al SARS-CoV-2 en 17 de 25 pangolines malayos

recolectados en la provincia de Guangdong al sur de China. Además, se describe que las estructuras de la glicoproteína Spike de los coronavirus RaTG13 y GX Pangolin-CoV, aisladas de especies de murciélago y pangolín respectivamente resultaron estar estrechamente relacionadas con la estructura del Spike del SARS-CoV-2 (Xiao *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2022).

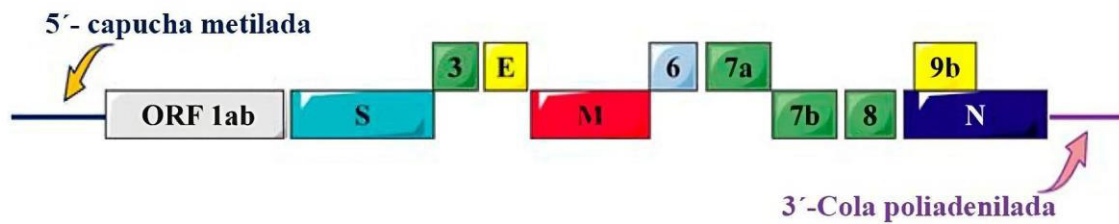
### **2.2.2 Características generales**

Como todos los coronavirus, el SARS-CoV-2 es un virus esférico con un diámetro de 60-100 nanómetros (nm) que está envuelto en una bicapa lipídica. Su genoma de ARN monocatenario de sentido positivo tiene una longitud aproximada de 30.000 nucleótidos (Figura 4a). La estructura de su genoma es la siguiente: ORF replicativo 1a/b, el extremo 5', proteína de espiga (S), proteína de envoltura (E), proteína de membrana (M), nucleoproteína (N), y proteínas accesorias como los ORFs 3, 6, 7a, 7b, 8 y 9b, culminando en el extremo 3' (Figura 4b) (Wrapp *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020).

### (a) Estructura general



### (b) Organización genómica

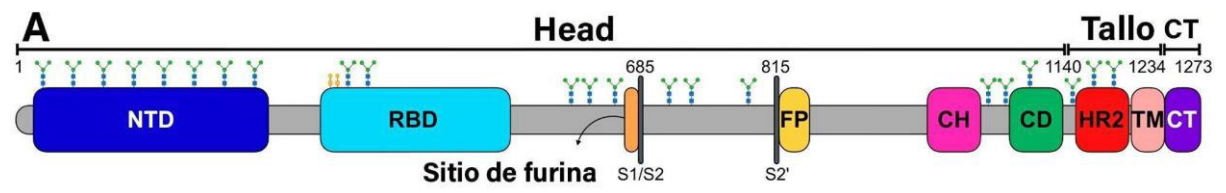


**Figura 4. a)** Estructura general del virus SARS-CoV-2 y sus proteínas estructurales. **b)** Organización genómica del SARS-CoV-2. Está dispuesto en el siguiente orden: extremo 5'; marco de lectura abierto (ORF) 1a/b; espiga (S); envoltura (E); membrana (M); proteína de la nucleocápside (N); proteínas accesorias como orf 3, 6, 7a, 7b, 8 y 9b; y el extremo 3' (Zhou *et al.*, 2020).

La proteína S del SARS-CoV-2 es una glicoproteína transmembranal de tipo I que incluye un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular. El dominio extracelular contiene dos subunidades, S1 y S2, cada una desempeñando un papel diferente en el reconocimiento, la unión al receptor y la fusión de membranas (Yoshimoto, 2020). La subunidad S1 estructurada en una forma ectotrimérica similar a una V apical incluye el dominio N-terminal (NTD) y el dominio C-terminal (CTD). El dominio de unión al receptor (RBD) se encuentra en el CTD, este dominio se une al ACE2 de la célula huésped para desencadenar la fusión de membranas (Coutard *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). La subunidad S2 contiene a la maquinaria necesaria para la fusión de membranas viral y celular, incluyendo el péptido de fusión (FP), la hélice central (CH), el dominio de conexión (CD), dominios de repetición heptad-1 y -2 (HR1, HR2), un dominio transmembrana (TM) y el tallo citoplasmático terminal (CT) (Figura 5) (Delmas y Laude, 1990; Casalino *et al.*, 2020).

Mediante Crio-microscopía electrónica (Crio-ME) se demostró que el trímero de la proteína S experimenta movimientos tipos bisagra entre dos conformaciones: el estado abierto donde uno de

los RBD se encuentra arriba (up conformation) permitiendo la interacción con el receptor, y el estado cerrado donde los tres RBD se encuentran abajo (down conformation) permitiendo el repliegue de S2 para la fusión de membranas (Gui *et al.*, 2017; Sternberg y Naojukat, 2020).



**Figura 5.** Esquema de la estructura completa de la proteína S. De izquierda a derecha: dominio N-terminal (NTD), dominio de unión al receptor (RBD), sitio de escisión de furina (S1/S2), péptido de fusión (FP), hélice central (CH), dominio de conexión (CD), dominio de repetición de heptad 2 (HR2), dominio transmembrana (TM) y cola citoplasmática (CT). También se representan iconos representativos para N-glicanos (rojo y verde) y O-glicanos (naranja) según su posición en la secuencia (Casalino *et al.*, 2020).

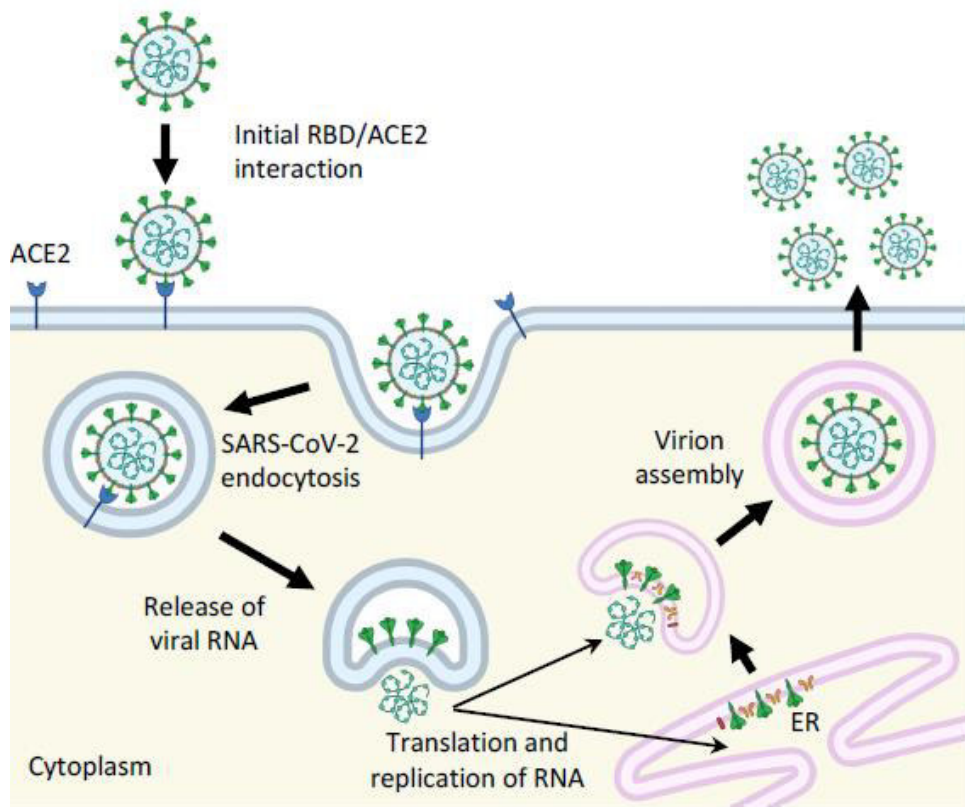
En cuanto a las otras proteínas estructurales, conservan las características típicas de los coronavirus, pero presentan algunas diferencias. Por ejemplo, la proteína M muestra una serina en el extremo N (Hasan y Hossain, 2020), mientras que la proteína E se distingue por la presencia de Arginina en la posición 69, en lugar de Glutamato, Glutamina o Aspartato como se encuentra en otras proteínas homólogas del SARS-CoV (Bianchi *et al.*, 2020).

### 2.2.3 Mecanismo de síntesis de ARN del SARS-CoV-2

La proteína S interactúa con el receptor ACE2 en la membrana plasmática de las células de varios tejidos, incluidos el hígado, el corazón y el pulmón, para iniciar el proceso de entrada del SARS-CoV-2 en la célula huésped (Raj *et al.*, 2013). La serina proteasa transmembrana 2 (TMPRSS2) de la superficie celular es la responsable de catalizar la escisión de la proteína S en sus subunidades S1 y S2, necesaria para que esta interacción sea efectiva. La subunidad S1, portadora del dominio de unión al receptor (RBD), facilita el acoplamiento de ACE2 con el virus, mientras que la subunidad S2 favorece la fusión del virus con las membranas celulares. Cuando la TMPRSS2 no está presente, la catepsina-L de los endosomas puede desempeñar una función comparable; sin embargo, esta vía alternativa provoca una tasa de infección más lenta. Este mecanismo asegura que el virus pueda adaptarse y entrar en una amplia gama de células huéspedes, lo que contribuye a su propagación y virulencia (Song *et al.*, 2019; Magazine *et al.*, 2023).

La membrana plasmática de la célula huésped se pliega para engullir la partícula vírica después de que el receptor la reconozca. Esta estructura, conocida como endosoma temprano, está rodeada por dos conjuntos de membranas lipídicas y es transportada para fusionarse con otra estructura celular, conocida como lisosoma, que está igualmente rodeada por dos conjuntos de membranas. El interior de esta estructura generada, conocida como fagolisosoma, presenta alteraciones metabólicas como la incorporación de glucosa y un descenso del pH (Masters, 2006). En lugar de destruir las partículas víricas como se pretendía, los endosomas tardíos no lo hacen, liberando el material genético vírico al citosol celular, una enorme zona con un pH más cercano a la neutralidad que el pH ácido de los fagolisosomas (Figura 6) (Zhu *et al.*, 2020)

Una vez liberado el genoma viral, este mimetiza al ARN mensajero celular al presentar una capucha metilada en el extremo 5' y una cola poliadenilada en el extremo 3'. Esta característica facilita la unión del genoma viral a los ribosomas eucariotas 80S del hospedador para su traducción, aprovechando la maquinaria celular (Ghosh *et al.*, 2020). La ARN-polimerasa dependiente de ARN, sintetizada a partir del extremo 5' del ARN viral, replica el genoma generando múltiples ARNm a partir de cadenas subgenómicas negativas. Estos ARNm subgenómicos dirigen la síntesis de proteínas virales tanto estructurales como no estructurales. Posteriormente, el montaje de estos componentes, junto con el ARN viral, se lleva a cabo en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, culminando en la formación de nuevos viriones que se liberan para infectar más células, perpetuando el ciclo viral (Figura 6) (Lan *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2020).



**Figura 6.** Esquema del mecanismo de síntesis de ARN del SARS-CoV-2 (Magazine *et al.*, 2023).

Como hallazgo de este proceso se origina el denominado efecto citopático, el cual es distintivo de cada tipo de virus y se manifiesta como indicio de la actividad viral dentro de la célula huésped. En el contexto del SARS-CoV-2, se observa la formación de sincitios celulares, conglomerados de células afectadas y células adyacentes en áreas específicas de los órganos diana, donde la replicación viral está activa (Taştan *et al.*, 2020).

#### 2.2.4 Variantes del SARS-COV-2 y sus características

Durante la fase de replicación del SARS-CoV-2, se producen cambios espontáneos en su secuencia genética. Aunque el genoma de ARN del virus parece bastante estable, se producen mutaciones adaptativas a un ritmo estimado entre  $10^{-6}$  -  $10^{-4}$  en cada ciclo replicativo (Ovsyannikova *et al.*, 2020). Tales mutaciones pueden afectar a la forma en que el antígeno espicular (S) interactúa con su receptor particular de la célula huésped (enzima convertidora de angiotensina 2). Esto podría alterar la capacidad de propagación del virus, su susceptibilidad a una respuesta inmunitaria y el grado de infección. Esto podría dar al virus una ventaja evolutiva

y promover la selección natural de variantes particulares (Lauring y Hodcroft, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

Hasta la fecha, las seis mutaciones más significativas son D614G, N501Y, E484K, P681H, L452R y T478K, cuyas características se detallan en el Cuadro 1 (Di Giacomo *et al.*, 2021; Jackson *et al.*, 2021; Nelson *et al.*, 2021; Pérez-Abeledo y Moreno, 2021). Aunque se ha divulgado principalmente la influencia de las mutaciones en la proteína S sobre los cambios fenotípicos del virus, también se están examinando los efectos de las mutaciones en las proteínas no estructurales (NSP). Un hallazgo reciente sobre la variante delta sugiere que una mutación en su proteína nsp12, parte del complejo RdRp, le confiere más estabilidad y por consecuencia una mayor capacidad de síntesis de ARN, desencadenando al desarrollo de una enfermedad más severa y de mayor mortalidad (Mason, 2020; Mlcochova *et al.*, 2021).

**Cuadro 1.** Principales variantes del SARS-CoV-2 con sus características más destacadas (Abeledo-Pérez y Moreno, 2021)

		VARIANTES				
Denominación coloquial	Original o salvaje	Británica	Sudafricana	Brasileña	Californiana	India
Linaje Pangolin	----	B 1.1.7	B.1.351	P.1	B.1.427	B.1.617
Denominación Nexstrain	----	201/501Y.V 1	20H/501.V2	20J/501Y.V3	20C/S;452R	20A
Mutaciones	D614G	D614G, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D118H	D614G, N501Y, D215G, K417N, E484K, A701V	D614G, N501Y, E484K, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, T1027I	D614G, L452R	D614G, N501Y L452R, E484Q
	----	Incremento del 50% en la capacidad de transmisión. Gravedad	Incremento del 50% en la capacidad de transmisión. Reducción	Reducción en la neutralización por suero convaleciente y postvacunal.	Incremento del 20% en la capacidad de transmisión. Reducción en la	Indicios de mayor transmisibilidad, patogenicidad y

<b>Características asociadas</b>	aumentada según tasas de hospitalización y letalidad. Reducción en la neutralización por suero convaleciente y postvacunal.	en la neutralización por suero convaleciente y postvacunal.	neutralización por suero convaleciente y postvacunal.	potencial reducción en la neutralización por suero postvacunal.
----------------------------------	---	---	---	---

La OMS clasifica las variantes del SARS-CoV-2 en diferentes categorías según su impacto en la salud pública. Estas categorías son: Variantes de Preocupación (VOC), Variantes de Interés (VOI) y Variantes de Alta Importancia (VOHC). Las VOC son aquellas que han demostrado cambios significativos en la transmisibilidad, virulencia o eficacia de las medidas de salud pública, como las vacunas. Las VOI tienen mutaciones que podrían afectar estas características y son monitoreadas por su potencial para convertirse en VOC. Hasta el momento, no se ha clasificado ninguna variante como VOHC, una categoría que se reservaría para variantes que impactan significativamente la eficacia de las medidas preventivas o médicas actuales (PHE, 2021).

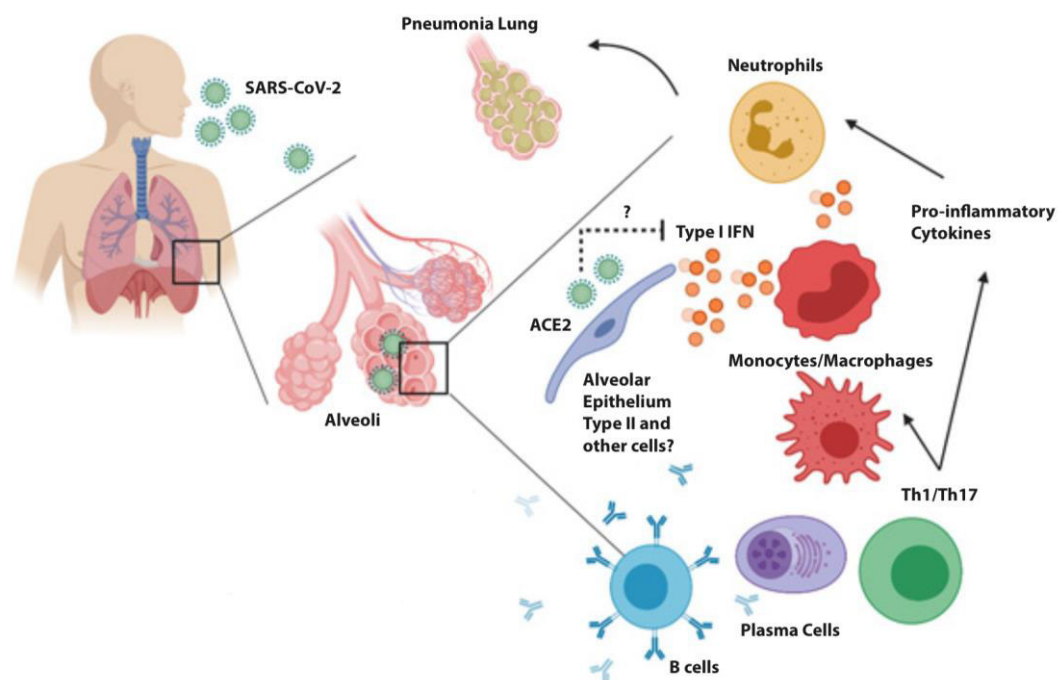
Para la nomenclatura de las variantes se puede utilizar el término vernáculo que suele corresponder a la nación o lugar de descubrimiento, un código de la base de datos Pangolin y un código basado en la página Nextstrain (GISAI, 2021; O'Toole *et al.*, 2021). Para facilitar la pronunciación y evitar estigmatizar a los países de origen de las variantes, la OMS propuso una nueva nomenclatura que utiliza el alfabeto griego (Konings *et al.*, 2021).

### 2.3 Respuesta inmune humana frente al SARS CoV-2

El SARS-CoV-2, al infectar al huésped, desencadena una serie de respuestas inmunológicas que varían significativamente entre individuos. Estas respuestas pueden clasificarse en dos categorías principales: respuestas innatas y adaptativas (Casalino *et.al.*, 2020; Chen *et.al.*, 2020).

### 2.3.1 Sistema inmune innato

El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa durante las primeras fases de una infección. Para causar daño o destrucción celular como resultado de su replicación, el SARS-CoV-2 infecta primero las células que recubren el epitelio de las vías respiratorias, incluidos los neumocitos de tipo 2 en los alvéolos, las células endoteliales y los macrófagos alveolares. Los macrófagos alveolares, los mastocitos, las células dendríticas, las células natural killer (NK) y otros mecanismos humorales de defensa detectan las señales de alarma emitidas por este daño (Gomez *et al.*, 2020; Harrison *et al.*, 2020).



**Figura 7.** Esquema de la respuesta inmune contra SARS-CoV-2 (Prompetchara *et al.*, 2020).

Cuando se estimula a los macrófagos a través de sus receptores de reconocimiento de patrones (PRR), se liberan citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$ , la IL-6, el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$ , junto con quimiocinas como la IL-8, la MCP1 y la IP-10. Para combatir la infección vírica e intensificar la respuesta inflamatoria, este proceso aumenta la permeabilidad vascular y favorece la rápida extravasación de monocitos, que se diferenciarán en neutrófilos, células dendríticas y macrófagos (Figura 7). (Otsuka y Seino, 2020; Tay *et al.*, 2020).

### 2.3.2 Sistema inmune adaptativo

En una fase posterior, se activa la respuesta inmune adaptativa la cual consiste principalmente en respuestas celulares (células T) y humorales (células B). Los linfocitos Th (colaboradores) juegan el papel de dirigir y regular la respuesta inmune lo cual logran mediante la liberación selectiva de citocinas, y en función de la correcta información proporcionada por la inmunidad innata ante la infección por SARS-CoV-2 (Sette y Crotty, 2021). Por su parte, los linfocitos Tc (citotóxicos) en su rol esencial se encargan de la eliminación de las células infectadas por el virus, mediante la liberación de gránulos citotóxicos, entre los que destacan la granzima B y perforina A (Diehl y Rincón, 2002; Prompetchara *et al.*, 2020).

Cuando las partículas del virus SARS-CoV-2 son reconocidas por las IgM e IgD contenidas en su membrana, las células B se activan. En respuesta a esta identificación se activan dos tipos distintos de linfocitos B, cada uno con trayectorias y funciones únicas. Por un lado, los linfocitos B extrafoliculares se activan rápidamente, se multiplican y se diferencian en linfocitos B plasmáticos, que producen cantidades significativas de IgM y, en algunos contextos inflamatorios, de IgG. Por el contrario, los linfocitos B que participan en una interacción dependiente del timo con linfocitos T activados pasan al folículo, donde experimentan una serie de cambios intrincados y graduales que finalmente dan lugar al desarrollo de linfocitos B plasmáticos de larga duración (Long *et al.*, 2020). Este proceso implica la creación de linfocitos B de memoria, la hipermutación somática en sus áreas de reconocimiento y el cambio de isotipo de IgM a IgA, IgG o IgE (en función de las citocinas recibidas de las células Th). Los anticuerpos resultantes muestran una mayor afinidad, lo que permite la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y la degranulación, así como la opsonización y la neutralización (McKechnie *et al.*, 2020; Paces *et al.*, 2020).

En gran parte de los casos de infección por SARS-COV-2, todos estos mecanismos defensivos son suficientes para contrarrestar la infección pulmonar, reducir la respuesta inflamatoria, iniciar la reparación de tejidos y conducir a la recuperación del paciente. Sin embargo, cerca del 20% de los pacientes experimentan una neumonía grave, vinculada a un estado hiperinflamatorio denominado "tormenta de citocinas" (Meckiff *et al.*, 2020). La IL-6 se identifica como una citocina particularmente crítica en este proceso, incrementándose significativamente en relación con la severidad de la enfermedad y llegando a ser un indicador clave para diferenciar entre los pacientes que logran sobrevivir al virus y aquellos que no (Atheyo *et al.*, 2020).

Según los datos relacionados con la sobreproducción de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 por parte del sistema inmunitario innato, el SARS-CoV-2 puede eludir o posponer la respuesta mediada por interferón

(IFN) de tipo I y III, impidiendo así la activación de las células T (Thoms *et al.*, 2020). En pacientes con casos graves, este déficit puede conducir a una repoblación celular innata agresiva, agravando así la inflamación. Por otro lado, los pacientes asintomáticos o que se están recuperando y tienen un pronóstico favorable tienen ciertas células T que producen IFN- $\gamma$ . Estos resultados llevan a la conclusión de que el éxito de la eliminación viral depende de una respuesta inmunitaria suficiente de tipo Th1 (Tay *et al.*, 2020).

Dado que el dominio RBD del SARS-CoV-2 es la porción más inmunogénica del virus, es el encargado de producir más del 90% de los anticuerpos neutralizantes que se observan en los pacientes. Al mismo tiempo, todos los individuos afectados adquieren anticuerpos IgM, IgA e IgG particulares dirigidos contra la proteína S (Sette y Crotty, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

La presencia de anticuerpos neutralizantes es clave para prevenir la infección viral, siendo este el fundamento de la vacunación; sin embargo, vale la pena resaltar que tanto la IgA como la IgG pueden ejercer una función opsonizante, lo cual en ciertas circunstancias podría favorecer la infección. Esto último mencionado se conoce como el fenómeno de mejora dependiente de anticuerpos (ADE Antibody-Dependent Enhancement) en el cual los anticuerpos opsonizantes (no neutralizantes) facilitan la entrada del virus en los macrófagos a través de los receptores Fc de su membrana (Blanco-Melo *et al.*, 2020). Este mecanismo también es aplicable a otras células del sistema inmune, como los neutrófilos o células dendríticas, que poseen estos receptores. Los macrófagos están equipados para destruir patógenos; sin embargo, algunos virus, incluido potencialmente el SARS-CoV-2, pueden tener mecanismos para evadir o sobrevivir dentro de estas células y conducir a una mayor replicación viral (Li *et al.*, 2020). En el contexto de COVID-19, la preocupación sobre el ADE surge porque el SARS-CoV-2 es un virus que ha demostrado tener cierta capacidad para evadir respuestas inmunitarias. Sin embargo, la evidencia de ADE en este virus sigue siendo limitada y es más una consideración teórica basada en experiencias con otros virus, como el dengue (Gómez *et al.*, 2020).

Un estudio realizado por Gaebler *et al.* evaluó la respuesta humoral en una cohorte de 87 personas analizadas en 1.3 y 6.2 meses después de la infección natural con SARS-CoV-2, en donde se encontró que aunque los títulos de anticuerpos IgM e IgG y su capacidad neutralizante disminuyeron significativamente con el tiempo, las células B de memoria específicas para el RBD persistieron hasta 6 meses después de la infección, mostrando cambios en la composición clonal y generando anticuerpos con mayor potencia de neutralización y amplitud. Estos datos sugieren que la persistencia de células B de memoria que continúan evolucionando podría proporcionar una respuesta humoral efectiva en caso de una nueva exposición al virus (Gaebler *et al.*, 2021).

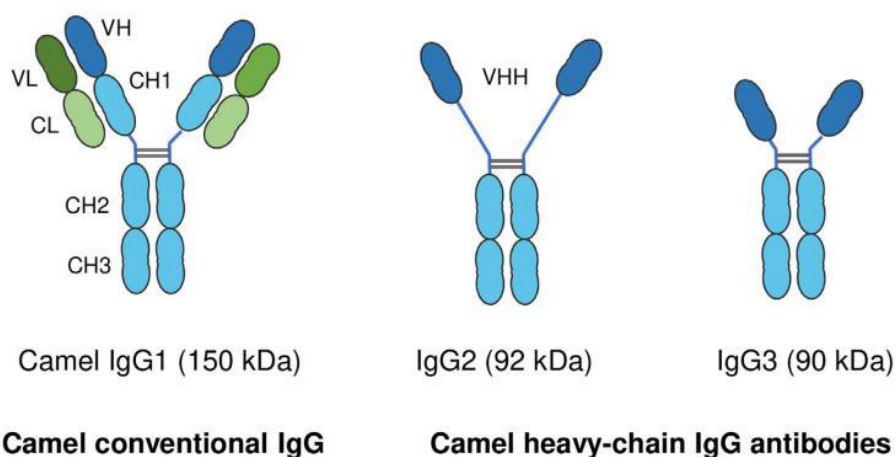
## 2.4 Anticuerpos de alpaca

La familia de los camélidos, que engloba tanto a las especies sudamericanas como a los camellos del Viejo Mundo, presenta características notables que generan gran interés en el campo científico, particularmente en inmunología. Estos mamíferos, que han evolucionado para adaptarse a condiciones extremas, desde los altiplanos andinos hasta los desiertos áridos, han desarrollado sistemas inmunológicos singulares que facilitan su supervivencia en dichos entornos desafiantes (Hussen y Schubert, 2021).

Dentro de su sistema inmune, los camélidos expresan los cinco isotipos de inmunoglobulinas típicos de los mamíferos (IgM, IgG, IgA, IgE, e IgD), destacando por su abundancia en la sangre las IgG e IgM. Sin embargo, en 1993 Hamers-Casterman *et al.* descubrieron en estos animales la presencia de isotipos de IgG que no contienen cadenas ligeras, un fenómeno no observado en otros mamíferos. Estos anticuerpos, compuestos exclusivamente por cadenas pesadas, recibieron el nombre de anticuerpos no convencionales o anticuerpos de cadena pesada (HCAbs, por sus siglas en inglés). Estos HCabs constituyen aproximadamente el 45% del total de IgG en el suero de las especies del género *Lama* spp. (guanaco y llama) y el 75% en el género *Camelus* spp. (camello y dromedario) (Hamers-Casterman *et al.* 1993; Daley *et al.*, 2010; Muyldermans *et al.*, 2013).

### 2.4.1 Características generales

Estos anticuerpos IgG se distinguen por poseer un único dominio variable (VHH) en vez de dos dominios variables (VH y VL) que hacen el equivalente al fragmento de unión a antígeno (Fab) de los anticuerpos IgG convencionales (Nguyen *et al.*, 2001). Estos anticuerpos están desprovistos del primer dominio constante de la cadena pesada (CH1), de modo que tienen una estructura de 6 dominios (cada cadena posee los dominios VHH, CH2 y CH3) (Figura 8). La omisión de este dominio se atribuye a un fenómeno de splicing alternativo, en donde el exón correspondiente al dominio CH1 se excluye del ARNm maduro a pesar de que está codificado en el genoma (Wernery, 2001).



**Figura 8.** Estructura de las subclases de la inmunoglobulina G (IgG) de camello (Hussen y Schubert, 2021)

Otra posible causa de la ausencia del dominio CH1 es la ausencia de la proteína chaperona de unión a cadena pesada (Binding immunoglobulin Protein o BiP según sus siglas en inglés), cuya función es unirse a las cadenas pesadas recién sintetizadas en el retículo endoplasmático para estabilizarlas y evitar su degradación o unión antes de que se asocien con las cadenas ligeras, todo eso como parte del control de calidad para asegurar que solo las inmunoglobulinas correctamente ensambladas y plegadas sean transportadas a la superficie celular o secretadas (Blond-Elguindi *et al.*, 1993). La asociación de BiP con las cadenas pesadas de los anticuerpos parece ocurrir a través de la interacción entre CH1 y VH, por lo tanto, la falta del segmento CH1 en los HCabs podría estar relacionada con la ausencia de BiP, lo que a su vez influiría en la secreción eficiente de estos anticuerpos al entorno extracelular (Knarr *et al.*, 1995; Krah *et al.*, 2015).

Se han identificado tres subclases específicas de IgG: IgG1, IgG2 e IgG3. De estas, IgG2 e IgG3 son notables por carecer de cadenas ligeras. La clasificación de estas subclases se basa tanto en la presencia o ausencia de cadenas ligeras como en las características de la secuencia de aminoácidos de la región bisagra (Caggiano *et al.*, 2014). Así, se distingue a IgG1 como una subclase convencional, mientras que IgG3, con una bisagra corta, e IgG2, con una bisagra larga, son clasificados como subclases no convencionales. Se cree que la serie de sustituciones aminoacídicas en las secuencias de los péptidos de estos anticuerpos sean una adaptación a la ausencia del segmento CH1 (Daley *et al.*, 2005; Daley- Bauer *et al.*, 2010).

Estas inmunoglobulinas poseen ventajas por sobre las convencionales, pues al carecer de cadena ligera, el dominio variable de unión a antígeno (VHH) se une directamente a la región bisagra sin el primer dominio constante (CH1), haciendo que el peso de IgG2 e IgG3 sea menor, 92kDa y

90kDa respectivamente; en comparación con la IgG1 convencional cuyo peso es de 150kDa (Dumoulin *et al.*, 2002). Al poseer menor peso molecular mejora su biodistribución permitiendo una mayor penetración al tejido. El VHH, siendo el fragmento peptídico más pequeño (15 KDa) con capacidad de unión antigénica en el rango micromolar, se destaca por su estructura de cadena peptídica única (Ferrari *et al.*, 2007). Esta singularidad facilita su expresión en bacterias y levaduras (De Simone *et al.*, 2008). A ello se suman sus excepcionales propiedades fisicoquímicas, como la capacidad de revertir la desnaturalización causada por cambios en temperatura y pH, lo que contribuye significativamente a su amplio potencial en aplicaciones industriales y biotecnológicas. (Decanniere *et al.*, 1999; Muyldermans *et al.*, 2001). Consecuentemente diferentes subisotipos fueron clasificados mediante análisis genómicos de secuencias de cadenas de ADN correspondiente a la región bisagra, descubriéndose que IgG1 posee dos subisotipos: IgG1a e IgG1b; y la IgG2 posee tres: IgG2a, IgG2b e IgG2c. (Vu K *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1998).

La región determinante de la complementariedad (CDR3) de estos tipos de anticuerpos de cadena pesada es otra característica digna de mención. A diferencia de los anticuerpos normales, es más larga y se inserta más profundamente en el sitio activo del antígeno, aumentando el área de acoplamiento necesaria para neutralizarlo por completo. Según varios estudios, contiene cinco aminoácidos más que el CDR de los anticuerpos convencionales porque contiene aminoácidos hidrófilos, que también confieren flexibilidad y solubilidad al dominio de unión al antígeno. Esto le permite reconocer epítomos a los que los anticuerpos convencionales no podrían unirse (Li *et al.*, 2016; Wesolowski *et al.*, 2009). Esto sugiere que contribuyen al desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral frente a microorganismos que alteran sus antígenos de superficie para eludir la detección (Stijlemans *et al.*, 2004).

En otro estudio se demostró que estos anticuerpos de cadenas pesadas son estables a temperaturas extremas, pues pudieron unirse al antígeno a una temperatura de 90°C. (Van Der Linden *et al.*, 2000). En general, los camélidos poseen una clase única de anticuerpos que ofrecen múltiples ventajas en comparación con los anticuerpos convencionales, especialmente en aplicaciones donde aspectos como la neutralización enzimática, el tamaño o la estabilidad son un problema (Desmyter *et al.*, 2001; Dumoulin *et al.*, 2002).

#### **2.4.2 Respuesta contra SARS-CoV-2**

Se sabe que los HCabs representan un gran porcentaje de las IgG, lo que concuerda con una función importante en la inmunidad en términos de sus funciones biológicas. (Desmyter *et al.*,

2013). Un estudio realizado por Daley *et al.* examinó la participación de anticuerpos IgG convencionales y HCabs en la defensa inmune de los camélidos dirigida contra el virus del Nilo Occidental (WNV) y se demostró que el tamaño reducido y la estructura distinta de la IgG3 de alpaca no impactó negativamente en su capacidad para neutralizar al virus; en contraste, la IgG2 pareció ser menos eficiente en la neutralización (Daley *et al.*, 2010).

Ante esto las alpacas se han vuelto una fuente común de generación de anticuerpos para investigación biomédica pues estos anticuerpos particulares pueden ser producidos en masa, debido al bajo costo de producción, además por su alta especificidad y afinidad. La especificidad se refiere a la capacidad de los anticuerpos para reconocer y unirse únicamente a un antígeno particular, mientras que la afinidad se relaciona con la fuerza con la que estos se unen a su antígeno específico (Mass *et al.*, 2007; Chow *et al.*, 2019).

Actualmente han sido reportados estudios donde caracterizan anticuerpos de cadena pesada de camélidos altamente específicos a la proteína S del SARS-CoV-2. En el 2020, Huo *et al.* produjeron dos nanoanticuerpos (fragmentos aún más pequeños y versátiles derivados de los anticuerpos de cadena pesada) a partir de la creación de una biblioteca de anticuerpos de llama y mediante criomicroscopía electrónica se reveló que se unían con mayor afinidad al dominio RBD de la porción S1 del SARS-CoV-2 bloqueando su unión a la ACE2 y así neutralizando al virus (Huo *et al.*, 2020).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar y tiempo de ejecución**

El estudio fue llevado a cabo entre abril del 2022 a febrero del 2023. Se utilizaron alpacas sin infección viral de coronavirus diagnosticada por PCR en heces y ausencia de anticuerpos contra coronavirus de alpacas y SARS Cov2 en suero sanguíneo por virus neutralización. Todas las alpacas fueron provenientes del IVITA Marangani, provincia de Canchis, departamento de Cusco- Perú. La muestras de heces y suero fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional mayor de San Marcos.

#### **3.2 Descripción del material experimental**

Se trabajó con el suero sanguíneo de 35 alpacas adultas clínicamente sanas las cuales fueron seleccionadas para su inmunización según los criterios de inclusión y exclusión descritos en el subíndice correspondiente. A continuación, se dividieron en siete grupos: un grupo de control inoculado con suero fisiológico y seis grupos experimentales para cada antígeno inoculado (Proteína S recombinante completa cepa Wuhan, fracción de la proteína S de las variantes alfa, beta y delta, SARS-CoV-2 completo aislado de lima brote 2020 y coronavirus de alpaca completo). Por disponibilidad se seleccionaron 5 alpacas para cada inmunógeno (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Distribución de los grupos y números de alpacas experimentalmente inmunizadas

Grupo	Inmunógeno	Número de alpacas
Experimental	Proteína S variante alfa	5
	Proteína S variante beta	5
	Proteína S variante delta	5
	Proteína S variante Wuhan	5
	SARS-CoV-2 completo	5
	Coronavirus alpaca	5
Control	Suero fisiológico	5

---

### 3.2.1 Criterios de muestreo

Antes de la inmunización, se realizó un muestreo por conveniencia de las alpacas de la estación IVITA Marangani basado en los siguientes criterios:

#### Criterios de inclusión

Alpacas clínicamente sanas, negativas a coronavirus de alpaca mediante análisis molecular (RT-PCR) y también negativas al análisis serológico (prueba de neutralización viral).

#### Criterios de exclusión

Alpacas clínicamente afectadas o tratadas con antibióticos en los últimos 3 meses, positivas a coronavirus de alpaca mediante análisis molecular (RT-PCR) y también positivas al análisis serológico (prueba de neutralización viral).

### 3.2.2 Consideraciones éticas

Se extrajeron las muestras de sangre con el consentimiento informado del director del IVITA-Maranganí; mediante un personal capacitado que incluía al tesista, al asesor de tesis y a un profesor de la misma estación, quien es un médico veterinario encargado de la Sanidad Animal y se encuentra involucrado en el proyecto. El manejo de los animales se llevó a cabo siguiendo el

protocolo establecido en la Autorización N.o 2009-001 del Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, garantizando el manejo adecuado de los animales sin dolor ni maltrato. Luego de la inmunización cada alpaca fue mantenida en observación durante 20 minutos para identificar cualquier reacción, asimismo fue con cada extracción de sangre realizada.

### **3.3 Diseño experimental**

#### **3.3.1 Selección de alpacas a inmunizar**

##### **3.3.1.1 Examen clínico**

Se consideraron varios aspectos para determinar la condición de salud de los animales que serían seleccionados. Se evaluó su nivel de alerta, condición corporal, temperatura, presencia de síntomas como tos, estornudos, descargas nasales, y la consistencia y color de sus heces. También se examinó su piel para detectar áreas sin pelo, ectoparásitos y abscesos; se revisó su cavidad oral en busca de espuma, úlceras y abscesos, sus oídos para evaluar inflamación, pus, costras y úlceras, y sus ojos en busca de lagañas, conjuntivas rojas y exudado purulento. Finalmente, se palpó su abdomen para detectar hinchazón y dolor.

Los animales que se determinaron como sanos fueron trasladados a otro corral con el fin de recolectar muestras de heces y sangre para su posterior análisis molecular y serológico. Estas muestras se mantuvieron en congelación a 4°C por aproximadamente 4 días hasta su uso.

##### **3.3.1.2 Análisis molecular para la detección de coronavirus de alpaca**

###### **3.3.1.2.1 Procesamiento de las muestras fecales**

Los procedimientos de clarificación y filtración se aplicaron a las muestras previamente descongeladas. Inicialmente, se prepararon muestras fecales al 10% a pH 7,2 en solución salina tamponada con fosfato y se centrifugaron durante 5 minutos a 2500x g. Posteriormente, se utilizaron filtros de 0,22 µm de diámetro para filtrar el sobrenadante resultante, eliminando los principales contaminantes como hongos, bacterias y parásitos. Para extraer el ARN viral, se utilizó el sobrenadante fecal depurado.

###### **3.3.1.2.2 Extracción de ARN**

Se extrajo el ARN empleando Trizol®LS (Ambion, life technologies) según las recomendaciones del fabricante. Se añadieron 300 µl de la muestra fecal y 900 µl de Trizol®LS (tiocinato de

guanidina + fenol) a un vial de 1,5 ml. Tras múltiples homogeneizaciones y un periodo de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 240 µl de cloroformo y se agitó la mezcla en vórtex. La mezcla se centrifugó a 12000g durante 15 min a 4°C tras una incubación adicional de 5 min a temperatura ambiente, capturándose la fase superior acuosa (que contiene el ARN genómico) y se llevó a un nuevo tubo Eppendorf. A continuación, se adicionó 600 µl de alcohol isopropílico, se agitó en vortex y se incubó en hielo durante 10 minutos. Luego se centrifugó por 10 minutos a 12000g a 4°C para precipitar el ARN genómico. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se agregó al pellet del tubo 1 ml de etanol al 75%, se agitó y se centrifugó por 5 minutos a 12000g a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante fue eliminado y el pellet fue dejado secar al medio ambiente por 10 minutos. Como último paso, se resuspendió el ARN en 30 µl de agua libre de nucleasas y se puso a incubar a 60°C durante 15 minutos. Al finalizar la incubación, el ARN fue guardado a -70°C hasta su uso.

### 3.3.1.2.3 Producción de ADN complementario (ADNc)

La obtención del ADNc se inició colocando 5 µL del ARN extraído de cada muestra en tubos de PCR para su desnaturalización incubándose en el termociclador a 95°C por 5 minutos, para después dejarlas enfriar por 5 minutos a 4°C.

La transcripción reversa (RT) fue realizada mediante el kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, USA) que proporciona todos los componentes para realizar el Master Mix (Cuadro 3). Se utilizó el primer reverso del Pancoronavirus (Cor-Rv) y la enzima transcriptasa reversa ImProm-II (Promega, Madison, Estados Unidos).

**Cuadro 3.** Componentes y cantidades del Master Mix para la transcripción reversa (RT)

RT Mix	Vol para 1 reacción
dH <sub>2</sub> O	0,4 ul
5X RT buffer	2 ul
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1,2 ul
dNTPs 10mM	0,6 ul
Primer Cor-Rv/reverso (20uM)	0,4 ul
Enzima RT Promega	0,4 ul
Total	5 ul

Se añadieron 5 µl de este mix a cada muestra de ARN en su respectivo tubo de PCR, la mezcla fue homogenizada y llevada al termociclador modelo T100TM (BIO-RAD, USA). El ciclo térmico para la retrotranscripción de este kit consistió en una temperatura inicial de 25°C durante 5 minutos, seguida de una temperatura de 42°C durante 1 hora para luego quedar a la temperatura final de 4°C. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta ser sometido a la reacción de PCR.

#### 3.3.1.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se tomó 5 µl del ADNc de cada muestra y 20 µl de la mistura (6,5 µl agua libre de nucleasas, 12,5 µl GoTaq r Green Master Mix, 2X (Promega USA), 0,5 µl de primers New Beta F y 0,5 New Beta 3XR específicos para todos los βCoV siguiendo el protocolo de Castilla et al. 2021 (cuadro 3) a una concentración de 20 µM para la generación de un fragmento de 227pb. Las amplificaciones fueron procesadas en un termociclador T100TM (BIO-RAD, USA). Las condiciones de cada ciclo de PCR se detallan en el cuadro 4. Se utilizaron los primers detallados en el cuadro 5.

**Cuadro 4.** Condiciones de la PCR para la detección de Panbetacoronavirus

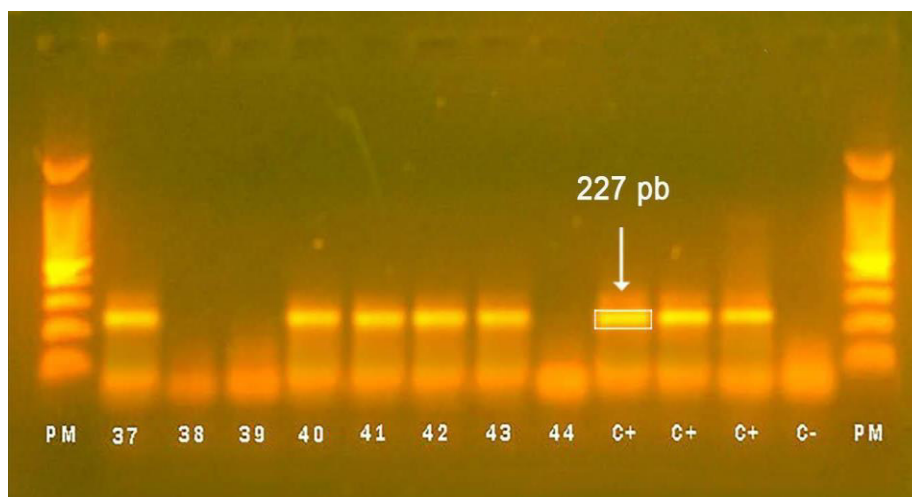
Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos
Desnaturalización Hibridación Elongación } (35 ciclos)	94°C	40 segundos
	57°C	1 minuto
	72°C	40 segundos
Extensión final	72°C	10 minutos

**Cuadro 5.** Oligonucleótidos utilizados en la reacción de RT- PCR para la detección de Panbetacoronavirus. Oligonucleótidos degenerados: W= A/T, Y= C/T, \*pb = pares de bases

Virus	Gen	Ensayo	Primers	Secuencia del primer	Posición	Tamaño del producto	Referencia
Todos los Cov	ORF1b	RT	Cor-Rv	TCRCAYT	15,153-	-	Moës et al., 2005
				TDGGRTA	15,172		
				RTCCCA			
Panbetacoronavirus	ORF1b	PCR	New Beta F	ATTAGTG	14,946–	227 pb	Castilla et al., 2021
				CWAAGA	14,971		
				ATAGAGC			
			New Beta 3X R	TCACAYT	15,148–		
				TWGGRT	15,172		
				ARTCCCA			
	DCCCA						

### 3.3.1.2.5 Electroforesis en gel de Agarosa

El análisis de los resultados de la reacción de RT-PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con TBE 0.5X (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,0089M; EDTA 0.025M, pH 8,3) adicionando 5 µl de bromuro de etidio (0,5 µg/ µl). Se aplicó 5 µl de cada producto de PCR al pocillo respectivo en el gel y sometido a una corriente de 120V por 100 minutos en buffer TBE 0,5X. Después de la corrida electroforética se visualizó con un transiluminador con luz ultravioleta y fotografiado con cámara digital. El tamaño del fragmento (227pb) fue estimado por comparación con un patrón de tamaño molecular de 100 pares de bases (Promega, USA).



**Figura 9.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos amplificados del RT-PCR BetaCoV, gen ORF1b (227pb). Línea PM:100 pb del marcador de ADN; las líneas del 37 al 44, muestras de heces; tres líneas +C, controles positivos de BCoV; línea -C, control negativo.

### 3.3.1.3 Análisis serológico para la detección de anticuerpos contra coronavirus de alpaca

Con el objetivo de determinar la posible presencia de anticuerpos contra el coronavirus de alpaca que sugieran la ocurrencia previa de una infección, se llevó a cabo la prueba de neutralización viral en microplacas descartables de 96 pocillos con todas las muestras de suero recolectadas según el protocolo disponible en la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la FMV-UNMSM.

Las muestras de suero se colocaron en Baño María a una temperatura de 56°C durante 30 minutos para su inactivación. Los controles de virus previamente titulados fueron preparados en concentraciones de 100 DI50 CC/50 µL (Dosis infectiva 50 en cultivo celular), 10 DI50 CC/50 µL, 1 DI50 CC/50 µL y 0.1 DI50 CC/50 µL. Se agregaron 50 µL de diluyente estéril (MEM + antibiótico) a cada pocillo de cada microplaca, a continuación, se agregaron 50 µL de cada suero en la primera hilera de la microplaca, desde la fila A hasta la H, creando una mezcla diluyente-suero. A partir de la primera hilera, se realizaron diluciones seriadas empezando con una dilución 1:2 (fila A), 1:4 (fila B) y hasta llegar a 1:256 (fila H). Posteriormente, se añadieron 50 µL de coronavirus de alpaca en concentración de 100 DI50 CC/50 µL a todos los pocillos, exceptuando al control celular. Las microplacas se incubaron a 37°C durante una hora. Luego de ese tiempo, se agregaron 100 µL de una suspensión de células VERO21 a cada microplaca, incluyendo los controles, para finalmente dejarlas incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 días. Se consideraron

negativas aquellas alpacas cuyos sueros daban un título de anticuerpos  $<1/2$ ; es decir, no tenían anticuerpos contra coronavirus de alpaca. (Victorio, 2004)

Finalmente fueron seleccionadas aquellas alpacas que resultaron negativas a coronavirus de alpaca mediante la prueba molecular y también las negativas a la presencia de anticuerpos mediante la prueba serológica, resultando un total de 35 alpacas a inmunizar. Todas fueron alpacas hembra, de raza Huacaya, pertenecientes al mismo rebaño y mayores a 2 años de edad. Estas alpacas fueron separadas del resto y colocadas en otro ambiente a la espera de su inmunización.

### 3.3.2 Inmunógenos

#### 3.3.2.1 Preparación de inmunógenos de cepas aisladas

El inóculo de SARS-CoV-2 fue obtenido de un aislado del tracto respiratorio de gato aparentemente normal con familia positiva a COVID-19 por inmunocromatografía. El aislado fue determinado como un Betacoronavirus mediante RT-PCR para el gen RdRp. Posteriormente el producto de esta PCR fue enviado a la reconocida Plataforma de secuenciamiento genómico Macrogen Inc. (Seúl, Corea) en la cual se utilizó el método de Sanger para obtener la secuencia de nucleótidos del virus detallado a continuación:

##### SARS-CoV-2 - aislado gato - gen RdRp

```
GAATAGAGCCCGCACCGTAGCTGGTGTCTCTATCTGTAGTACTATGACCAATAGAC
AGTTTCATCAAAAATTATTGAAATCAATAGCCGCCACTAGAGGAGCTACTGTAGTA
ATTGGAACAAGCAAATTCTATGGTGGTTGGCACAACATGTTAAAACTGTTTATAG
TGATGTAGAAAACCCTCACCTTATGGGCTGGGATTACCCTAAATGTG
```

Al comparar esta secuencia de nucleótidos en la base de datos del programa BLAST® [[www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)] se pudo confirmar que se trataba de SARS-CoV-2 (Figura 10).

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected		Download <input type="button" value="v"/> Select columns <input type="button" value="v"/> Show 100 <input type="button" value="i"/>						
		<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	<a href="#">Distance tree of results</a>				
		<a href="#">MSA Viewer</a>						
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute res...	387	387	100%	7e-103	99.07%	29846	<a href="#">OY610300.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute res...	387	387	100%	7e-103	99.07%	29847	<a href="#">OY610222.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute res...	387	387	100%	7e-103	99.07%	29847	<a href="#">OY575028.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute res...	387	387	100%	7e-103	99.07%	29890	<a href="#">OY574637.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute res...	387	387	100%	7e-103	99.07%	29851	<a href="#">OY566916.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute res...	387	387	100%	7e-103	99.07%	29890	<a href="#">OY566827.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute res...	387	387	100%	7e-103	99.07%	29890	<a href="#">OY534261.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute res...	387	387	100%	7e-103	99.07%	29890	<a href="#">OY532511.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute res...	387	387	100%	7e-103	99.07%	29890	<a href="#">OY532110.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute res...	387	387	100%	7e-103	99.07%	29890	<a href="#">OY515419.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute res...	387	387	100%	7e-103	99.07%	29890	<a href="#">OY511313.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute res...	387	387	100%	7e-103	99.07%	29890	<a href="#">OY502133.1</a>

**Figura 10.** Alineamiento múltiple de las secuencias nucleótidos obtenidas del SARS-CoV-2 mediante el programa de BLAST.

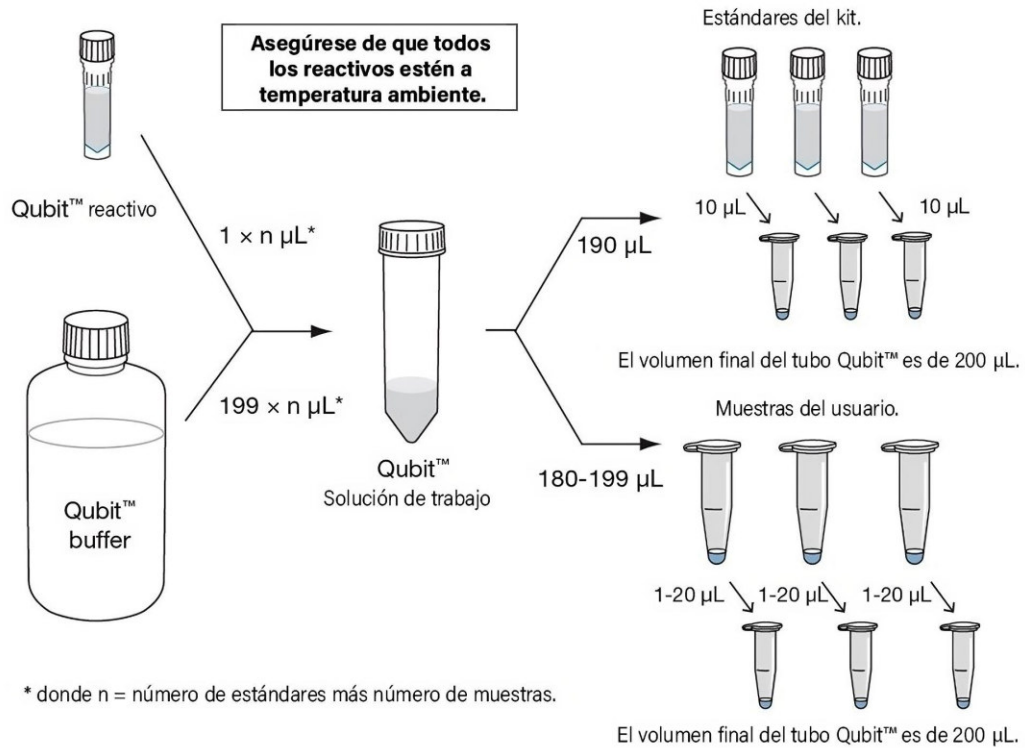
Respecto al coronavirus de alpaca, el laboratorio contaba con el virus cultivado en células VERO.

La preparación de los inmunógenos a partir de estos virus aislados fue hecha de la misma manera (Reyes *et al.*, 2017). En primer lugar, fueron sembrados en células VERO observándose a los cuatro días el efecto citopático característico de los coronavirus, posteriormente fueron cosechados y sometidos al siguiente procedimiento:

- Inicialmente se llevaron a cabo tres ciclos de congelación y descongelación, seguidos de una centrifugación a 2500rpm durante 10 minutos.
- Tras este proceso se obtuvo un sobrenadante de 15ml el cual fue sometido a precipitación con acetona en una proporción 50:50 (15ml de sobrenadante y 15ml de acetona), dejándose incubar a 20°C durante 30 minutos.
- Se rescata el pellet obtenido para continuar con la preparación del inóculo, añadiéndosele 1ml de albúmina y 100ul de formaldehído para luego dejarlo incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Finalmente se agrega 1ml de adyuvante de FREUDS para obtener la emulsión.

Luego de obtener ambos productos, se procedió a cuantificar sus proteínas utilizando la técnica de fluorometría a través del Qubit Protein Assay. Este ensayo es capaz de detectar muestras con concentraciones de proteínas en un rango que va desde 12.5 µg/mL hasta 5 mg/mL, permitiendo así calcular con precisión la concentración de las proteínas obtenidas en la unidad de medida necesaria. (Figura 11).

Para el lisado completo de SARS-CoV-2 el resultado fue de 732 ug/ml y para el coronavirus de alpaca se obtuvo un resultado de 744 ug/ml, indicando en ambos casos una cantidad adecuada de antígenos a inocular.



**Figura 11.** Esquema del protocolo de cuantificación de proteínas utilizando Qubit Protein Assay. (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33211?SID=srch-srp-Q33211>)

### 3.3.2.2 Inmunógenos obtenidos de laboratorios comerciales

Las fracciones de la proteína S de las variantes alfa, beta y delta del SARS-CoV-2 fueron obtenidas del laboratorio BPS Bioscience (California, EE.UU.). Y la proteína S Recombinante completa cepa Wuhan fue obtenida del laboratorio CUSABIO (Houston, EE.UU.).

Las especificaciones de cada antígeno se encuentran descritas en el cuadro a continuación (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Características de los inmunógenos obtenidos de laboratorios comerciales.

Variante	Nombre coloquial	Linaje Pangolin	Proteína S	Mutaciones importantes	Concentración inicial	Concentración final a inocular	Volumen a inocular por alpaca
Alfa	Británica	B 1.1.7	S1 + S2	N501Y P681H D614G	650 ug/ml	14.2 ug/ml	1ml
Beta	Sudafricana	B 1.351	S1 + S2	N501Y K417N D614G E484K	510 ug/ml	14.2 ug/ml	1ml
Delta	India	B.1.617.2	S1	L452R E484Q D614G	2990 ug/ml	14.2 ug/ml	1ml
Original o Wuhan	Salvaje	No demoninado	S1	D614G	20 ug/ml	4 ug/ml	1ml

### 3.3.3 Inmunización de alpacas

A los dos días de haber sido seleccionadas según los criterios de inclusión y exclusión previamente explicados, las alpacas del grupo experimental fueron identificadas con un arete según el antígeno inoculado. Las alpacas del grupo control fueron identificadas con un arete de color diferente.

La primera inmunización fue realizada por vía subcutánea a nivel de la base del cuello usando una aguja de calibre 21, esto con el fin de estimular la respuesta inmune con la participación activa de células presentadoras de antígenos. Pasando 15 días se realizó la segunda inmunización vía intramuscular en la región del tríceps femoral para estimular la respuesta inmune adaptativa humoral. Al término de cada inoculación se mantuvo a las alpacas bajo observación durante un

lapso de 20 minutos, con el propósito de identificar posibles reacciones alérgicas severas, tales como aumento de la temperatura rectal por encima de 39.5°C, debilidad, vómitos, dificultad respiratoria o diarrea.

Las alpacas del grupo control fueron inoculadas con suero fisiológico manteniendo el mismo lapso de 15 días entre cada una de las aplicaciones (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Esquema de inmunización de las alpacas

<b>GRUPO</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 16</b>	<b>Día 31</b>
Experimental	Primera inmunización	Segunda inmunización	Recolección muestras sanguínea
Control	Primera inoculación con suero fisiológico	Segunda inoculación con suero fisiológico	Recolección muestras sanguíneas

### **3.3.4 Obtención de sueros**

Transcurrido 15 días después de haberse realizado la segunda inmunización, se procedió a la extracción de sangre de cada alpaca a través de la vena yugular.

En las alpacas la vena yugular no es prominentemente visible al aplicar presión, por lo que se utiliza el proceso transversal de las vértebras cervicales como punto de referencia para realizar la hemostasia en la zona medial de dicho proceso. Con el uso de agujas vacutainer de 20G x 1.5”, la sangre de cada alpaca fue drenada a recipientes estériles de 50ml con su correspondiente rótulo. Las alpacas fueron supervisadas durante 20 minutos luego de la extracción para detectar cualquier signo de sangrado. La sangre extraída fue dejada a coagular naturalmente a 15-20°C durante una hora, lo que permitió la separación del suero sanguíneo en la parte superior. Luego, se recolectó el suero con una pipeta Pasteur en tubos de centrifuga de 20 ml y se centrifugó a 500 g por 10 minutos. El suero centrifugado se almacenó en frascos estériles de 5 ml y se mantuvo a una temperatura de 10°C para su uso posterior.

### **3.3.5 Detección de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 mediante la prueba de neutralización viral**

La prueba de neutralización viral se erige como el estándar de oro para la identificación de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra un virus específico. En esta prueba se enfrentan el

suero a analizar en distintas concentraciones contra el virus dentro de un medio donde se encuentra una monocapa de células, esto con el fin de evaluar los anticuerpos mediante su capacidad para interrumpir la infección viral, es decir neutralizar el virus. En este contexto, el efecto citopático asume un papel crucial en la cuantificación de los títulos de anticuerpos.

Cuando los anticuerpos presentes en el suero cuentan con la capacidad de neutralizar el virus, se evidenciará un efecto citopático escaso o inexistente en las células indicando que lograron bloquear la infección viral. De este modo se permite deducir los títulos de los anticuerpos.

El protocolo de neutralización viral es el mismo al explicado anteriormente, con la variación en este caso que los controles de virus que se prepararon fueron utilizando la cepa viral de SARS-CoV-2 que se aisló en el Laboratorio de Virología. Las microplacas se incubaron a 37°C durante una hora. Luego de ese tiempo, se agregaron 100 µL de una suspensión de células VERO-21 a toda la microplaca, incluyendo los controles, y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Al finalizar, se realizó la lectura e interpretación de los resultados.

### **3.3.6. Análisis de la información**

Se empleó el software estadístico R para el desarrollo de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con el fin de determinar la existencia de diferencia estadística significativa entre los títulos de anticuerpos de cada antígeno, seguido del análisis *post hoc* correspondiente.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Detección de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2

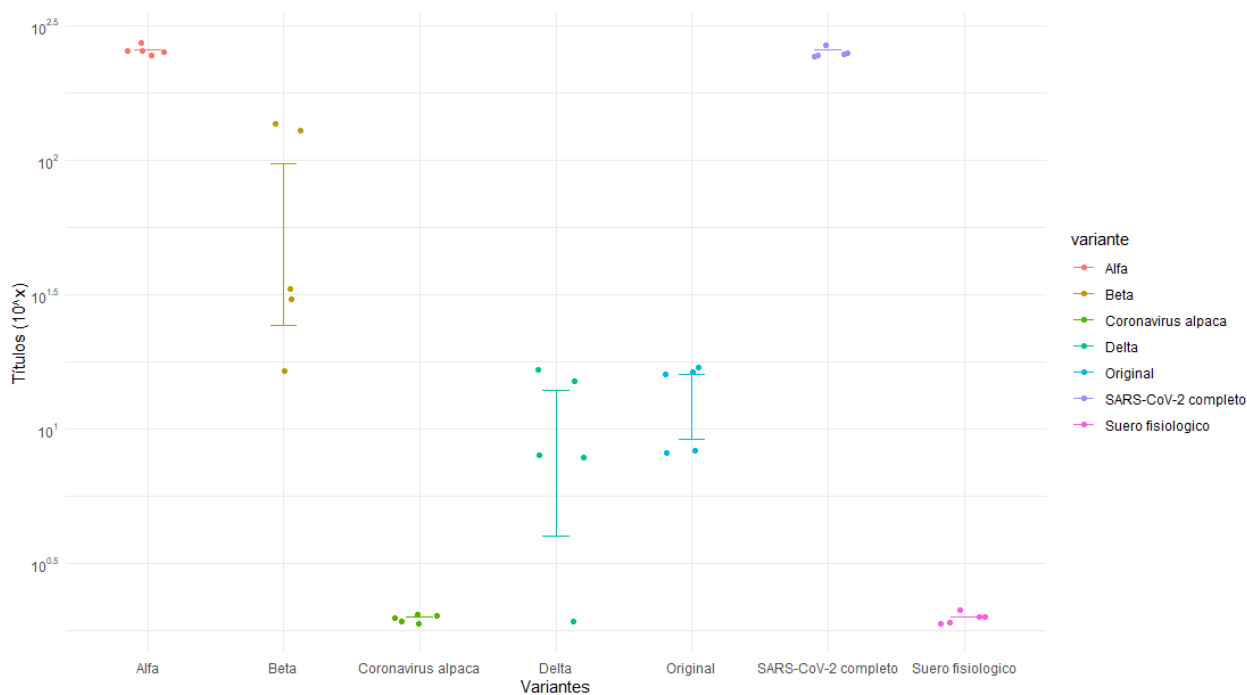
La prueba de neutralización viral final fue realizada enfrentando los anticuerpos obtenidos de los sueros de todas las alpacas inmunizadas contra los distintos inmunógenos previamente descritos versus el antígeno del virus completo SARS-CoV-2 aislado. El título de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 se determinó como la dilución más alta del suero en la cual la infectividad fue neutralizada en el 100% de las células en los pocillos. La seropositividad (presencia de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2) se definió como un título  $\geq 1/8$ .

Los resultados de la neutralización viral se muestran en el Cuadro 8 y Figura 12. El inmunógeno de la proteína S de la variante alfa indujo anticuerpos neutralizantes en todas las alpacas (n=5) con un título de anticuerpos  $\geq 1/256$ ; el inmunógeno de la proteína S de la variante beta también indujo anticuerpos neutralizantes en todas las alpacas (n=5) con títulos diferentes de 1/16 (n=1), 1/32 (n=2) y 1/128 (n=2). En caso del inmunógeno de la proteína S de la variante delta solo una alpaca no produjo anticuerpos neutralizantes (título  $\leq 1/2$ ), las otras 4 fueron seropositivas, con título 1/8 (n=2) y con título 1/16 (n=2); para el inmunógeno de la proteína S de la variante original o Wuhan, todas las alpacas (n=5) produjeron anticuerpos neutralizantes, con título 1/8 (n=2) y con título 1/16 (n=3).

En el caso del inmunógeno SARS-CoV-2 completo inactivado, indujo anticuerpos neutralizantes en todas las alpacas (n=5) con un título de  $\geq 1/256$ ; mientras que el inmunógeno de coronavirus de alpaca no produjo anticuerpos neutralizantes en ninguna alpaca inmunizada, resultando un título de ( $\leq 1/2$ ), similar a lo obtenido con los sueros de las alpacas (n=5) del grupo control.

**Cuadro 8.** Número de alpacas distribuido en su resultado de título de anticuerpos por cada antígeno inoculado.

	Negativo (<1/2)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
<b>Proteína S Variante Alfa</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>5</b>
<b>Proteína S Variante Beta</b>	-	-	-	-	<b>1</b>	<b>2</b>	-	<b>2</b>	-
<b>Proteína S Variante Delta</b>	<b>1</b>	-	-	<b>2</b>	<b>2</b>	-	-	-	-
<b>Proteína S Variante original o Wuhan</b>	-	-	-	<b>2</b>	<b>3</b>	-	-	-	-
<b>SARS-CoV-2 lisado completo</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>5</b>
<b>Coronavirus alpaca</b>	<b>5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Suero fisiológico</b>	<b>5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-



**Figura 12.** Gráfico de dispersión de las respuestas de títulos de anticuerpos por cada antígeno inoculado realizado en R. Los títulos han sido expresados en escala logarítmica.

## 4.2 Análisis estadístico

Como resultado de la prueba de Kruskal Wallis en R, con un nivel de significancia de 0.05 se determinó que se rechaza la hipótesis nula ( $p= 0,00001375$ ), es decir los resultados de los títulos de anticuerpos son estadísticamente diferentes.

Tras realizarse el análisis *post hoc* se pudo obtener entre cuales antígenos existe esta diferencia significativa, resumido en el siguiente cuadro:

**Cuadro 9.** Diferencias estadísticas ( $p<0.05$ ) entre los resultados de anticuerpos por cada antígeno indicado por superíndices <sup>a,b,c,d,e</sup>.

<b>Antígeno</b>
<b>Proteína S variante Alfa</b> <sup>a</sup>
<b>Proteína S variante Beta</b> <sup>b</sup>
<b>Proteína S variante Delta</b> <sup>c</sup>
<b>Proteína S variante original o Wuhan</b> <sup>c,d</sup>
<b>SARS-CoV-2 lisado completo</b> <sup>a</sup>
<b>Coronavirus alpaca</b> <sup>e</sup>
<b>Suero</b> <sup>e</sup>

Estadísticamente, las respuestas de anticuerpos hacia las proteínas S de las variantes alfa, beta y delta exhiben diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, es importante destacar que la respuesta de los anticuerpos neutralizantes ante la proteína S de la variante alfa no muestra diferencia ( $p>0.05$ ) con respecto a la respuesta de anticuerpos neutralizantes con el virus completo SARS-CoV-2. Por otro lado, la respuesta de anticuerpos ante la proteína S de la variante original muestran discrepancias ( $p<0.05$ ) con la respuesta de la mayoría de los inmunógenos, a excepción de la proteína S de la variante delta. Además, la respuesta de los anticuerpos contra el coronavirus de alpaca presenta diferencias significativas ( $p<0.05$ ) con lo obtenido de todos los antígenos a excepción del suero control. Estos resultados determinan que los anticuerpos IgG son capaces de neutralizar al virus SARS-CoV-2, demostrando así su especificidad, además existe una inmunidad

cruzada entre las distintas variantes de SARS-CoV-2 y no se evidencia una reacción cruzada con el coronavirus de alpaca.

## V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en nuestra investigación refuerzan una vez más la capacidad de la proteína S del SARS-CoV-2 para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. Al comparar la respuesta de neutralización viral de las alpacas inoculadas solo con la porción S de la variante alfa y aquellas inoculadas con el virus completo del SARS-CoV-2 se obtuvo en ambas el mismo título de anticuerpos ( $\geq 1/256$ ), además no se observa diferencia estadística al comparar estas dos respuestas ( $p > 0.05$ ). La proteína S ha demostrado ser altamente inmunogénica, es decir, tiene la capacidad de estimular una fuerte respuesta inmunitaria en el organismo, desde su entrada mediante los receptores tipo toll (TLRs) hasta la producción de anticuerpos (Zhao *et al.*, 2021). Mediante análisis computacional se ha encontrado que múltiples residuos de la proteína S probablemente interactúan con TLR1, TLR4 y TLR6. Los sitios predichos en esta interacción se encuentran predominantemente en la subunidad S1 de Spike (Bhattacharya *et al.*, 2020; Choudhury y Mukherjee, 2020). Y mediante el análisis matemático de la entropía de Shannon (SE), se determinó una baja entropía genética indicando una baja tasa de variabilidad genética dentro de esta región, sugiriendo que los residuos que interactúan con TLR son relativamente conservados. Por lo tanto, es probable que las respuestas inmunitarias inducidas por la vacuna hacia estas regiones puedan inducir protección cruzada y duradera incluso en la aparición de nuevas variantes. (Barnes *et al.*, 2020; Wang C *et al.*, 2020).

En cuanto a la respuesta humoral, aunque múltiples regiones de la proteína S son capaces de provocar respuestas de anticuerpos, solo un pequeño subconjunto de estos anticuerpos parece ser capaz de inhibir la infección por SARS-CoV-2 cuando se utilizan en ensayos de neutralización (Xiaojie *et al.*, 2021). Un estudio reciente de Magazine *et al.* profundizaron en la respuesta inmunológica contra la proteína Spike del SARS-CoV-2, revelando que, aunque se genera una respuesta inmune contra casi todas las regiones de esta proteína, solo ciertos sitios inducen una

respuesta efectiva en la prevención de la infección (Magazine *et al.*, 2023). Esto debido a que muchos de los epítomos reconocidos por los anticuerpos de los pacientes presentan altas tasas de mutación dentro del RBD, esto como parte de su papel para evadir la respuesta inmune (Röltgen *et al.*, 2021). En cambio, aquellos epítomos ubicados en el dominio S2, específicamente en los residuos 809-876 y 1140-1166, mostraron baja variabilidad genética y fueron reconocidos eficazmente por los anticuerpos, resultando en una neutralización efectiva. Por lo tanto, tales epítomos probablemente serían objetivos prometedores para el desarrollo de vacunas universales, ya que los anticuerpos de los pacientes dirigidos a estas áreas probablemente serían abundantes, altamente neutralizantes y menos propensos a perder efectividad contra las nuevas líneas emergentes de SARS-CoV-2 (Candido *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2020).

En nuestro estudio se ha obtenido una estrecha correlación serológica entre la respuesta de anticuerpos contra SARS-CoV-2 de las alpacas inmunizadas con la proteína S de la variante alfa y las inmunizadas con el lisado completo SARS-CoV-2, esto podría deberse a que el aislado viral usado para la preparación del inmunógeno de este último fue obtenido a partir de muestras de un gato infectado en julio del 2020, durante la primera ola de la pandemia de COVID-19 en el Perú. En un reporte realizado por Padilla-Rojas *et al.* secuenciaron 34 genomas SARS-CoV-2 procedentes de diversas regiones, durante el inicio de la pandemia en Perú. Como resultado se identificaron seis linajes genéticos del SARS-CoV-2 (A2, A5, B.1, B1.1, B1.1.1, B1.5) de acuerdo con el análisis de GISAID y Pangolin. La mayoría de las secuencias peruanas del SARS-CoV-2 obtenidas aquí fueron clasificadas como clado B.1 (38%, n = 13), y particularmente dentro del subclado B.1.1.1 (29.4%, n = 10) clasificados en la variante alfa (Padilla-Rojas *et al.*, 2020; Gutiérrez-Tudela *et al.*, 2021).

En este estudio se constata que la proteína S de la variante beta también es capaz de generar anticuerpos neutralizantes en todas las alpacas inoculadas; sin embargo, los títulos de anticuerpos obtenidos fueron inferiores en comparación con los títulos obtenidos por la inmunización con el virus SARS-CoV-2 completo, mostrando además una diferencia estadística ( $p < 0.05$ ). Estos resultados sugieren la existencia de altos niveles de reacción cruzada serológica entre estas variantes (Tegally *et al.*, 2021). Esta reacción cruzada se atribuye a que la variante beta presenta modificaciones en la proteína S en algunos de sus epítomos; sin embargo, se mantiene intactos aquellos epítomos que son responsables de generar anticuerpos neutralizantes contra la cepa alfa (Hoffman *et al.*, 2021).

En cuanto a la comparación entre la respuesta obtenida en títulos de anticuerpos contra SARS-CoV-2 de la proteína S de la variante beta y la respuesta obtenida con los demás antígenos el análisis estadístico demostró diferencia significativa entre todas ellas ( $p < 0.05$ ). En un estudio hecho por Zhou *et al.* se analizó la actividad neutralizante de la variante beta en comparación con un aislado relacionado a la cepa original Wuhan, denominado “Victoria” en el estudio. El estudio utilizó pseudotipos portando las proteínas S de las variantes B.1.351 (beta), P.1 (gamma) y B.1.1.7 (alfa) del SARS-CoV-2 para investigar su neutralización mediante la Prueba de reducción de foco de neutralización (FRNT por sus siglas en inglés). Para este análisis, los pseudotipos se incubaron con plasma derivado de pacientes con COVID-19 o suero de individuos vacunados con la vacuna Pfizer-BioNTech BNT162b2. Entre los resultados se encontró que tenía niveles de neutralización significativamente reducidos en comparación con la cepa Victoria. Además las muestras plasmáticas convalecientes mostraron una reducción de 13.3 veces en el título de neutralización entre Victoria y la variante beta. Los anticuerpos resistentes a ciertas mutaciones en la variante B.1.351, como K417N, E484K y N501Y, mostraron resiliencia y títulos de neutralización similares entre Victoria y B.1.351 (Caly *et al.*, 2020; Seemann *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021).

Respecto a la respuesta de anticuerpos neutralizantes tras la inmunización con la proteína S de la variante delta contra el virus completo SARS-CoV-2, nuestros resultados muestran que en 1 alpaca no se desarrollaron anticuerpos neutralizantes y en las 4 alpacas restantes el título de anticuerpos no fue muy alto, lo cual sugiere que las modificaciones realizadas en la proteína S de esta variante han afectado ciertos epítomos que normalmente son responsables de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. Este resultado es consistente con investigaciones anteriores que evaluaron la sensibilidad de esta variante a los anticuerpos monoclonales y a los anticuerpos presentes en sueros de personas recuperadas o vacunadas contra el COVID-19. (Lopez *et al.*, 2021). Ciertos anticuerpos monoclonales dirigidos contra los dominios NTD y RBD han demostrado ser ineficaces contra la versión Delta. Cuando se tomaron sueros de pacientes que se habían recuperado hasta 12 meses después de la aparición de los síntomas, mostraron una eficacia cuatro veces menor contra la variante Delta que contra la forma Alfa. Los sueros de quienes recibieron una dosis única de las vacunas de Pfizer o AstraZeneca apenas inhibieron la Delta. Sin embargo, la administración de dos dosis de la vacuna resultó en una respuesta neutralizante en el 95% de los sujetos, aunque con niveles de anticuerpos de tres a cinco veces inferiores contra Delta en comparación con Alfa. Por lo tanto, la expansión de la variante Delta se asocia con una capacidad de evasión de los anticuerpos que se enfocan en los epítomos RBD y no RBD de la proteína espiga. (Planas *et al.*, 2021). Tras comparar la respuesta de anticuerpos neutralizantes de este antígeno frente a los demás, se obtuvo que existe diferencia estadística con

todos ellos excepto con el antígeno de la proteína S de Wuhan, en donde se obtuvo un  $p > 0.05$  demostrando que no existe diferencia significativa entre las respuestas de ambos antígenos.

En el transcurso del estudio, se ha logrado determinar que el coronavirus que afecta a las alpacas no produce anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 en ninguna de las alpacas a pesar de pertenecer ambos al mismo género de *Betacoronavirus*. La inexistencia de inmunidad cruzada entre estas dos cepas podría explicarse por su ubicación en diferentes subgéneros. Específicamente, el coronavirus de alpaca se engloba en el subgénero *Embecovirus*, mientras que el SARS-CoV-2 se clasifica en el subgénero *Sarbecovirus* (Lopez *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2015)

En algunos estudios han determinado una reacción cruzada entre SARS-COV-2 y algunas cepas virales de humanos como en la cepa HCoV 119, especulándose que los coronavirus que afectan animales mamíferos también podrían inducir anticuerpos neutralizantes por reacción cruzada, sin embargo, en este estudio determinamos que no existe reacción cruzada inmunogénica entre el coronavirus de alpaca y el SARS-CoV-2 humano. La reacción cruzada se debe a que la proteína S contiene múltiples determinantes antigénicos que inducen una respuesta inmune humoral eficiente; sin embargo, esta tiene una tasa de variación que determina nuevas variantes virales que producen cambios en estos determinantes antigénicos, haciendo poco efectivos los anticuerpos generados de epítomos no modificados (Wrapp D. *et al.*, 2020)

El estudio sobre la reactividad cruzada de anticuerpos contra coronavirus humanos y animales reveló resultados significativos: los pacientes recuperados de COVID-19 mostraron respuestas de anticuerpos no solo contra SARS-CoV-2, sino también contra una amplia gama de otros coronavirus humanos (como OC43, HKU1, NL63, 229E, SARS-CoV, y MERS-CoV) y 49 cepas de coronavirus animales (aCoVs) procedentes de diversas especies como murciélagos, roedores, aves y animales domésticos (Klompus *et al.*, 2021). Se observó una reactividad cruzada notable, indicando que los anticuerpos generados por la infección con un coronavirus pueden reconocer y reaccionar con antígenos de otros coronavirus. Este hallazgo subraya la posibilidad de desarrollar estrategias de diagnóstico que puedan detectar infecciones zoonóticas emergentes a partir de respuestas inmunitarias a coronavirus conocidos, ofreciendo una herramienta potencialmente valiosa para la vigilancia y respuesta rápida frente a futuras pandemias (Kim *et al.*, 2020).

En nuestro caso no hemos podido realizar el secuenciamiento completo de la proteína S de nuestro aislado, lo que nos impide realizar un estudio bioinformático preciso de los sitios modificados entre esta cepa y las proteínas S de las variantes alfa, beta, delta y Wuhan trabajadas en este estudio, sin embargo serológicamente nuestros resultados indicaría que es una cepa de la variante

alfa y que es más concordante con el estudio epidemiológico de la cepa prevalente en Lima durante la causada por la primera ola de COVID-19 que era provocada por esta variante (Gutiérrez-Tudela *et al.*, 2021) .

En nuestro estudio se determina que las alpacas son animales que reaccionan inmunogenicamente contra las distintas proteínas S de las variantes del SARS-CoV-2, siendo utilizadas como modelo animal para la producción de anticuerpos específicos contra este virus. Se tiene el reporte de Hanke *et al.*, donde inmunizaron una alpaca con la porción S1 del SARS-CoV-2 y mediante el método de exposición en fagos se aisló un nanoanticuerpo el cual llamaron Ty1. Para determinar si neutralizaba al SARS-CoV-2, el nanoanticuerpo fue enfrentado a partículas lentivirales pseudotipadas con la proteína de espiga de SARS-CoV-2 mediante la prueba de neutralización *in vitro*. Como resultado se tuvo que se une directamente al RBD con alta afinidad, bloqueando el ACE2, evitando así la infección viral (Hanke *et al.*, 2020; Pardon *et al.*, 2014).

Las limitaciones del presente estudio se centran en que las concentraciones de los antígenos son diferentes. En primer lugar, la concentración de la proteína S de las variantes alfa, beta y delta (14.2ug/ml cada uno) difieren de la concentración de la proteína S de la variante Wuhan (4ug/ml). No obstante, investigaciones previas de inmunización en ratones han demostrado que dosis de 5 ug/ml generan respuestas de anticuerpos protectivos a SARS-CoV-2, lo que permitió su análisis mediante neutralización viral (Pavel *et al.*, 2021; Offersgaard *et al.*, 2023). Estos hallazgos sugieren que la concentración de antígeno utilizada en este estudio podría ser suficiente para inferir conclusiones sobre la respuesta de los anticuerpos. En segundo lugar, no se pudo obtener una cuantificación exacta de los antígenos S del SARS-CoV-2 completo y coronavirus de alpaca, debido a que la cuantificación de sus proteínas totales (732 ug/ml y 744ug/ml respectivamente) incluye también otras proteínas virales inmunogénicas y proteínas celulares obtenidas durante la cosecha viral. Otra limitación es el ambiente de campo en el cual se encontraban las alpacas, al ser un espacio libre y no completamente controlado, las alpacas podrían estar expuestas a otros agentes ambientales con capacidad inmunogénica que podrían afectar la respuesta inmune contra los inmunógenos inoculados.

## **VI. CONCLUSIONES**

- 1.- La proteína S del SARS-CoV-2 y sus distintas subunidades (S1, S2) inducen a la producción de anticuerpos neutralizantes en alpacas.
- 2.- Existe reacción cruzada inmunogénica entre las proteínas S de las distintas variantes (alfa, beta, delta y Wuhan) con diferencia estadística entre ellas.
- 3.- No hay evidencia de inmunidad cruzada entre coronavirus de alpaca y SARS-CoV-2.
- 4.- El lisado completo SARS-CoV-2 obtenido en el laboratorio y utilizado en la prueba de neutralización viral es serológicamente similar a la variante alfa.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- 1.- Debido a la aparición de variantes que cambian sus epítomos inductores de anticuerpos neutralizantes, se debe continuar con los estudios inmunológicos de las variantes de SARS-CoV-2 presentes en la población peruana para detectar a tiempo variantes que escapen a la respuesta inmune de las cepas usadas en vacunas o en secuencias conocidas de la proteína S para producción de vacunas ARN usadas en las campañas de vacunación.
  
- 2.- Continuar con los estudios inmunológicos de los coronavirus en camélidos como potenciales virus zoonóticos.
  
- 3.- Se debe continuar con los estudios inmunológicos en camélidos sudamericanos, por demostrar una fuerte respuesta inmune humoral, son potenciales productores de nanoanticuerpos neutralizantes contra los epítomos de las de SARS-CoV-2 para utilizarse en diagnóstico, inmunoterapia o biosensores.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Angelini MM, Akhlaghpour M, Neuman BW, Buchmeier MJ. 2013.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio.*;4(4):pii: e00524-13.
2. **Atyeo C, Fischinger S, Zohar T, Slein MD, Burke J, Loos C, Mcculloch DJ, Newman KL, Wolf C, Yu J, et al. 2020.** Distinct Early Serological Signatures Track with Sars-Cov-2 Survival. *Immunity.* 53:524–532.e4
3. **Banks R C, Garcete Fornells L A M, Rojas M, Liberal M, Manchego A, Pezo D, Santos N. 2018.** Molecular epidemiology of coronavirus in faeces of Brazilian calves and Peruvian camelid herds. *J Infect Dev Ctries* 12(1):037-042
4. **Beniac DR, Andonov A, Grudeski E, Booth TF. 2006.** Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat Struct Molecular Biology* ;13(8): 751-752.
5. **Bhardwaj K, Sun J, Holzenburg A, Guarino LA, Kao CC. 2006.** RNA recognition and cleavage by the SARS coronavirus endoribonuclease. *J Mol Biol.*;361(2):243-256
6. **Bhattacharya M, Sharma AR, Mallick B, Sharma G, Lee SS, Chakraborty C. 2020.** Immunoinformatics approach to understand molecular interaction between multi-epitopic 638 regions of SARS-CoV-2 spike-protein with TLR4/MD-2 complex. *Infect Genet Evol* 85, 639 104587.
7. **Bianchi M, Benvenuto D, Giovanetti M, Angeletti S, Ciccozzi M, Pascarella S. 2020.** Sars-CoV-2 Envelope and Membrane Proteins: Structural Differences Linked to Virus Characteristics? *Biomed Res Int.* doi: 10.1155/2020/4389089
8. **Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. 2020.** Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell.* 2020;181(5):1036-1045.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026.

9. **Blond-Elguindi S, Cwirla SE, Dower WJ, Lipshutz RJ, Sprang. 1993.** Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell.* 75(4):717-728.
10. **Bosch BJ, Van der Zee R, De Haan CA, Rottier PJ. 2003.** The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J. Virol.* 77, 8801–8811.
11. **Bouvet M, Imbert I, Subissi L, Gluais L, Canard B, Decroly E. 2012.** RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* ;109(24):9372-9377.
12. **Bouvet M, Lugari A, Posthuma CC, ZevenhovenJC, Bernard S, Betzi S, Imbert I, Canard B, Guillemot JC, Lécine P, Pfeifferle S, Drosten C, Snijder EJ, Decroly E, Morelli X. 2014.** Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes. *J Biol Chem.*;289(37):25783-96. doi: 10.1074/jbc.M114.577353.
13. **Buonavoglia C, Decaro N, Martella V, Elia G, CampoloM, Desario C, Castagnaro M, Tempesta M. 2006.** Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerg Infect Dis.*;12(3):492-4. doi: 10.3201/eid1203.050839. PMID: 16704791; PMCID: PMC3291441
14. **Caly L, Druce J, Roberts J, Bond K, Tran T, Kostecki R, Yoga Y, Naughton W, Tairaoa G, Seemann T. 2020.** Isolation and rapid sharing of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) from the first patient diagnosed with COVID-19 in Australia. *Med. J. Aust.*;212:459–462
15. **Candido KL, Eich CR, de Fariña LO, Kadowaki MK, da Conceição Silva JL, Maller A, Simão RCG. 2022.** Spike protein of SARS-CoV-2 variants: a brief review and practical implications. *Braz J Microbiol.* 2022 Sep;53(3):1133-1157. doi: 10.1007/s42770-022-00743-z.
16. **Caggiano N, Saccodossi N, Gentile T, Chiappe MA, Leoni J, De Simone E. 2014.** Caracterización de IGM, IGG total, IGG1 y anticuerpos de cadena pesada en calostro

de llamas (LAMA GLAMA) mediante ELISA. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 8(2):29-40

17. **Casalino L, Gaieb Z, Goldsmith J, Hjorth C, Dommer A, Harbison A, Fogarty C, Barros E, Taylor B, McLellan J, Fadda E, Amaro R. 2020.** Beyond Shielding: The Roles of Glycans in SARS-CoV-2 Spike Protein. Version 2. bioRxiv. doi: 10.1101/2020.06.11.146522
18. **Castilla D, Escobar V, Ynga S, Llanco L, Manchego A, Lázaro C, Navarro D, Santos N, Rojas M. 2021.** Enteric Viral Infections among Domesticated South American Camelids: First Detection of Mammalian Orthoreovirus in Camelids. *Animals*, 11, 1455.
19. **Chang C, Hou MH, Chang CF, Hsiao CD, Huang T. 2014.** The SARS coronavirus nucleocapsid protein - Forms and functions. *Antiviral Res*; 103:39-50. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.antiviral.2013.12.009>
20. **Chaudhuri A. 2020.** Comparative analysis of non structural protein 1 of SARS-CoV2 with SARS-CoV1 and MERS-CoV: An *in silico* study. *Journal of Molecular Structure*, Volume 1243, 2021,130854, ISSN 0022-2860, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130854>
21. **Chen C, Zhang XR, Ju ZY, & He WF. 2020.** Advances in the research of cytokine storm mechanism induced by Coronavirus Disease 2019 and the corresponding immunotherapies. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 36(0), 1–10
22. **Chen Y, Liu Q, Guo D. 2020.** Emerging coronaviruses: Genome structure, replication and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*. 92:418–423
23. **Choudhury A, Mukherjee S. 2020.** In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *J Med Virol*. 92, 2105-2113.
24. **Chow KM, Whiteheart SW, Smiley JR, Sharma S, Boaz K, Coieman MJ, Maynard A, Hersh LB, Vander Kooi CW. 2019.** Immunization of Alpacas (Lama pacos) with Protein Antigens and Production of Antigen-specific Single Domain Antibodies. *J. Vis. Exp.* (143).

25. **Claverie JM. 2020.** A Putative Role of de-Mono-ADP-Ribosylation of STAT1 by the SARS-CoV-2 Nsp3 Protein in the Cytokine Storm Syndrome of COVID-19. *Viruses*. Jun 15;12(6):646. doi: 10.3390/v12060646
26. **Cornillez-Ty CT, Liao L, Yates JR, Kuhn P, Buchmeier MJ. 2009.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. *J Virol.*;83:10314–10318
27. **Cottam EM, Whelband MC, Wileman T. 2014.** Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. *Autophagy*. 10(8):1426-1441.
28. **Coutard B, Valle C, De Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. 2020.** The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.*;176: 104742. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104742
29. **Cui J, Li F, Shi ZL. 2019.** Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 17, 181–192.
30. **Daley LP, Gagliardo LF, Duffy MS, Smith MC, Appleton JA. 2005.** Application of Monoclonal Antibodies in Functional and Comparative Investigations of Heavy-Chain Immunoglobulins in New World Camelids. *Clin Diagn Lab Immunol*. Mar; 12(3): 380–386
31. **Daley LP, Kutzler MA, Bennett BW, Smith MC, Glaser AL, Appleton JA. 2010.** Effector functions of camelid heavy-chain antibodies in immunity to West Nile virus. *Clin Vaccine Immunol* Feb;17(2):239-46.
32. **Daley-Bauer LP, Purdy SR, Smith MC, Gagliardo LF, Davis WC, Appleton JA. 2010.** Contributions of Conventional and Heavy-Chain IgG to Immunity in Fetal, Neonatal, and Adult Alpacas. *Clin Vaccine Immunol*. Dec; 17(12): 2007–2015.
33. **Decanniere, K., A. Desmyter, M. Lauwereys, M. A. Ghahroudi, S. Muyldermans, and L. Wyns. 1999.** A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: non-canonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops. *Structure* 7:361–370.

34. **Decaro N, Pratelli A, Campolo M, Elia G, Martella V, Tempesta M, Buonavoglia C. 2004.** Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR. *J Virol Methods*;119(2):145-50. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.03.012.
35. **Decroly E, Debarnot C, Ferron F, Bouvet M, Coutard B, Imbert I, Gluais L, Papageorgiou N, Sharff A, Bricogne G, Ortiz-Lombardia M, Lescar J, Canard B. 2011.** Crystal structure and functional analysis of the SARS-coronavirus RNA cap 2'-O-methyltransferase nsp10/nsp16 complex. *PLoS Pathog*;7(5):e1002059. doi: 10.1371/journal.ppat.1002059.
36. **DeDiego ML, Alvarez E, Almazan F, et al. 2007.** A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol*. 2007;81(4):1701-1713.
37. **Delmas B, Laude H. 1990.** Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virology* ;64(11):5367-5375.
38. **De Simone EA, Saccodossi N, Ferrari A, Leoni J. 2008.** Development of ELISAs for the measurement of IgM and IgG subclasses in sera from llamas (*Lama glama*) and assessment of the humoral immune response against different antigens. *Vet Immunol and Immunopathol* 126:64-73.
39. **Desmyter A, Decanniere K, Muyldermans S, Wyns L. 2001.** Antigen Specificity and High Affinity Binding Provided by One Single Loop of a Camel Single-domain Antibody. 276 (28, P26285-26290
40. **Desmyter A, Farenc C, Mahony J, Spinelli S, Bebeacua C, Blangy S, Cambillau C 2013.** Viral infection modulation and neutralization by camelid nanobodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Journal of Biological Chemistry*. 110(15), E1371–E1379.
41. **Diehl S, Rincón M. 2002.** The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunology* ;39(9):531-6. doi: 10.1016/S0161-5890(02)00210-9
42. **Di Giacomo S, Mercatelli D, Rakhimov A, Giorgi FM. 2021.** Preliminary report on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARSCoV-2) Spike mutation T478K. *J Med Virology* ;jmv.27062. doi:10.1002/jmv.27062.

43. **Dumoulin M et.al. 2002.** Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci.* Mar;11(3):500-15
44. **Eckerle LD, Becker MM, Halpin RA, et al. 2010.** Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLOS Pathog.*;6(5):e1000896
45. **Fang SG, Shen H, Wang J, Tay FPL, Liu DX. 2008.** Proteolytic processing of polyproteins 1a and 1ab between non-structural proteins 10 and 11/12 of coronavirus infectious bronchitis virus is dispensable for viral replication in cultured cells. *Virology.*;379(2):175-180
46. **Fehr AR, Perlman S. 2015.** Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biology* ;1282:1-23.
47. **Ferrari A, Rodríguez MM, Power P, Weill FS, De Simone EA, Gutkind G, Leoni J. 2007.** Immunobiological role of llama heavy-chain antibodies against a bacterial betalactamase. *Vet Immunol Immunopathol* 15:173-182
48. **Gadlage MJ, Sparks JS, Beachboard DC, et al. 2010.** Murine hepatitis virus nonstructural protein 4 regulates virus-induced membrane modifications and replication complex function. *J Virol.*;84(1):280-290.
49. **Gaebler, C., Wang, Z., Lorenzi, J.C.C. et al. 2021.** Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature* 591, 639–644. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03207-w>
50. **Ge XY, Yang WH, Zhou JH, Li B, Zhang W, Shi ZL, Zhang YZ. 2017.** Detection of alpha-and betacoronaviruses in rodents from Yunnan, China. *Virology Journal* 14(1):1–11.
51. **GISAID - NextStrain. 2021.** COVID-19 Phylogeny. [Internet] [18 noviembre 2023]. Disponible: <https://www.gisaid.org/phylogenetics/global/nextstrain/>
52. **Ghosh S, Dellibovi-Ragheb TA, Kerviel A, Pak E, Qiu Q, Fisher M, et al. 2020.**  $\beta$ -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell.* 2020;183(6):1520-1535.e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.039.

53. **Gómez-Rial J, Rivero-Calle I, Salas A, Martinon-Torres F. 2020.** Role of monocytes/macrophages in covid-19 pathogenesis: implications for therapy. *Infect Drug Resist.*;13:2485-93.
54. **Gui M, Song W, Zhou H, Xu J, Chen S, Xiang Y, Wang X. 2017.** Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Res.*;27(1):119-129. doi: 10.1038/cr.2016.152.
55. **Gupta SK, Minocha R, Thapa PJ, Srivastava M, Dandekar T. 2022.** Role of the Pangolin in Origin of SARS-CoV-2: An Evolutionary Perspective. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 9115. <https://doi.org/10.3390/ijms23169115>
56. **Gutiérrez-Tudela JW. 2021.** La pandemia de la COVID-19 en el Perú: análisis epidemiológico de la primera ola. *Rev la Soc Peru Med Interna.*; 34(2):51-2. doi: 10.36393/SPMI.V34I2.595.
57. **Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Bajjana Songa E, Bendahman N, Hamers R. 1993.** Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446±448.
58. **Hanke L et al. 2020.** An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.06.02.130161>
59. **Harrison AG, Lin T, Wang P. 2020.** Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol. Elsevier*; 2020;41(12):1100-15. doi: 10.1016/j.it.2020.10.004.
60. **Hasan S, & Hossain MM. 2020.** Analysis of COVID-19 M Protein for Possible Clues Regarding Virion Stability, Longevity and Spreading. <https://doi.org/10.31219/osf.io/e7jkc>
61. **Hoffmann M, Prerna A, Rüdiger G, et al. 2021.** SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies | Elsevier Enhanced Reader. *Cell.*;184:1–10. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.019.
62. **Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL, Makino S. 2011.** SARS coronavirus ns1 protein induces template dependent endonucleolytic

cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *PLOS Pathog.*;7(12):e1002433.

63. **Huo 2020** *Huo J, Le Bas A, Ruza R R, Duyvesteyn H M E, Mikolajek H, Malinauskas T, Tan T K, Rijal P, Dumoux M, Ward P N, Ren J, Zhou D, Harrison P J, Weckener M, Clare D K, Vogirala V K, Radecke J, Moynié L, Zhao Y, Gilbert-Jaramillo J, Knight M L, Tree J A, Buttigieg K R, Coombes N, Elmore M J, Carroll M W, Carrique L, Shah P N M, James W, Townsend A R, Stuart D I, Owens R J, Naismith J H, 2020.* Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2, *Nature Structural & Molecular Biology* 27, pages 846–854
64. Hurst KR, Koetzner CA, Masters PS. 2009. Identification of in vivo interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein. *J Virology*;83(14):7221-7234.
65. **Hussen J and Schuberth HJ. 2021.** Recent Advances in Camel Immunology. *Front. Immunol.* 11:614150
66. **Ivanov KA, Hertzog T, Rozanov M, Bayer S, Thiel V, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. 2004.** Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*;101:12694–12699
67. **Jackson CB, Zhang L, Farzan M, Choe H. 2021.** Functional importance of the D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein. *Biochem Biophys Res Commun.*;538:108-15. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.11.026.
68. **Jia Z, Yan L, Ren Z, et al. 2019.** Delicate structural coordination of the severe acute respiratory syndrome coronavirus Nsp13 upon ATP hydrolysis. *Nucleic Acids Res.*;47(12):6538-6550.
69. **Jin L, Cebra CK, Baker RJ, Mattson DE, Cohen SA, Alvarado DE, Rohrmann GF 2007.** Analysis of the genome sequence of an alpaca coronavirus. *Virology* 365: 198–203
70. **Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, et al. 2020.** Structure of Mpro from COVID-19 virus and discovery of its inhibitors. *Nature* 582, 289–293. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>

71. **Krah, S., Schröter, C., Zielonka, S., Empting, M., Valldorf, B., & Kolmar, H. 2015.** Single-domain antibodies for biomedical applications. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 38(1), 21–2
72. **Kim H, Seiler P, Jones JC, Ridout G, Camp KP, Fabrizio TP, Jeevan T, Miller LA, Thom RE, Ferrara F, et al. 2020.** Antibody Responses to SARS-CoV-2 Antigens in Humans and Animals. *Vaccines*.; 8(4):684. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040684>
73. **Kipar A, Meli M, Baptiste K, Bowker L, Lutz H. 2010.** Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *J. Gen. Virol.* 91: 1698–1707. Doi: 10.1099/vir.0.020214-0
74. **Knarr G, Gething MJ, Modrow S, Buchner J. 1995.** BiP Binding Sequences in Antibodies. *Protein chemistry and structure* volume 270, issue 46, p27589-27594. DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.270.46.27589>
75. **Konings F, Perkins MD, Kuhn JH, Pallen MJ, Alm EJ, Archer BN, et al 2021.** SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern naming scheme conducive for global discourse. *Nat Microbiol.* Nature Publishing Group; 1-3. doi: 10.1038/s41564-021-00932-w.
76. **Klompus S, Leviatan S, Vogl T, Mazor RD, Kalka IN, Stoler-Barak L, Nathan N, Peres A, Moss L, Godneva A, Kagan Ben Tikva S, Shinar E, Dvashi HC, Gabizon R, London N, Diskin R, Yaari G, Weinberger A, Shulman Z, Segal E. 2021.** Cross-reactive antibodies against human coronaviruses and the animal coronavirome suggest diagnostics for future zoonotic spillovers. *Sci Immunol.* 29;6(61):eabe9950. doi: 10.1126/sciimmunol.abe9950.
77. **Kyriakidis NC, López-Cortés A, González EV, Barreto A, Ortiz E. 2021.** SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. *npj Vaccines* 6, 28.
78. **Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S. et al. 2020.** Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581, 215-220.
79. **Lauring AS, Hodcroft EB. 2021.** Genetic Variants of SARS-CoV-2-Do They Mean?. *JAMA.* ;325(6):529-31. doi: 10.1001/jama.2020.27124.

80. **Li H, Liu L, Zhang D, Xu J, Dai H, Tang N, et al. 2020.** SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *The Lancet*.;395(10235):1517-20. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30920-X
81. **Li X, Duan X, Yang K, Zhang W, Zhang C, Fu L, et al. 2016.** Comparative Analysis of Immune Repertoires between Bactrian Camel's Conventional and Heavy-Chain Antibodies. *PLoS ONE* 11(9): e0161801
82. **Livingston E, Bucher K, Rekito A. 2020.** Coronavirus Disease 2019 and Influenza 2019-2020. *JAMA*, 323(12), 1122–1122.
83. **Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, Liao P, Qiu JF, Lin Y, Cai XF, et al. 2020.** Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.*;26:845–848
84. **Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, et al. 2021.** Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N Engl J Med.*;385:585–594. doi: 10.1056/nejmoa2108891
85. **Luna L, Brandão PE, Maturrano L, Rosadio R, Silva FDF, Soares RM, Gregori F. 2015.** Betacoronavirus 1 in alpacas (Vicugna pacos) in the High Peruvian Andes. *Small Rumin Res* 133: 7–9.
86. **Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W. and Tan, W. 2020.** Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 395, 565-574
87. **Magazine N, Tianyi Zhang, Anang D. Bungwon, Michael C. McGee, Yingying Wu, Gianluca Veggiani, Weishan Huang. 2023.** Immune Epitopes of SARS-CoV-2 Spike Protein and Considerations for Universal Vaccine Development. *bioRxiv* 2023.10.26.564184; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.10.26.564184>
88. **Mason RJ. 2020.** Pathogenesis of COVID-19 from a cell biologic perspective. *Eur Respir J.* 2020; doi: 10.1183/13993003.00607-2020.

89. **Masters PS. 2006.** The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 66, 193-292
90. **McKechnie JL, Blish CA. 2020.** The Innate Immune System: Fighting on the Front Lines or Fanning the Flames of COVID-19?. *Cell Host Microbe.*;27(6):863-9. doi: 10.1016/j.chom.2020.05.009.
91. **Meckiff BJ, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, Chee SJ, Kusrudi A, Simon H, Eschweiler S, Grifoni A, Pelosi E, Weiskopf D, et al. 2020.** Imbalance of regulatory and cytotoxic SARS-CoV-2-reactive CD4+ T cells in COVID-19. *Cell.*;183:1340–1353.e16.
92. **Mlcochova P, Kemp S, Dhar MS, Papa G, Meng B, Mishra S, et al. 2021.** SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant emergence and vaccine breakthrough. *Research Square*. p. 721.
93. **Muyldermans S. et al., 2001.** Advantages of single-domain antigen-binding fragments derived from functional camel heavy-chain antibodies. In: Van Broekhoven et al. (eds), *Novel Frontiers in the Production of compounds for Biomedical Use*, pp. 209±226. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
94. **Muyldermans S. 2013.** Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem.* 82 775-797, (2013)
95. **Nal B, Chan C, Kien F, Siu L, Tse J, Chu K, Kam J, Staropoli I, Crescenzo-Chaigne B, Escriou N, van der Werf S, Yuen KY, Altmeyer R. 2005.** Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J Gen Virol.*;86(Pt 5):1423-1434. doi: 10.1099/vir.0.80671-0.
96. **Nelson G, Buzko O, Spilman P, Niazi K, Rabizadeh S, Soon-Shiong P. 2021.** Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant. *bioRxiv.* 2021.01.13.426558. doi: 10.1101/2021.01.13.426558

97. **Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, et al. 2011.** A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biology*;174(1):11-22.
98. **Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdiá-Báguena C, et al. 2014.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLOS Pathog*;10(5):e1004077.
99. **Nguyen VK, Muyldermans S, Hamers R. 1998.** The specific variable domain of camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J. Mol. Biol.* 275:413–418
100. **Nguyen VK, Desmyter A, Muyldermans S, 2001.** Functional heavy-chain antibodies in Camelidae, *Adv. Immunol.*, 79, 261-296.
101. **O'Toole Á, Scher E, Underwood A, Jackson B, Hill V, McCrone J, et al. 2021.** PANGO lineages [Internet][26 noviembre 2023]. Disponible: <https://cov-lineages.org/index.html>
102. **Otsuka R, Seino KI. 2020.** Macrophage activation syndrome and COVID-19. *Inflamm Regen.* ;40:19.
103. **Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Crooke SN, Poland GA, Kennedy RB. 2020.** The role of host genetics in the immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 susceptibility and severity *Immunol Rev.*, 296, pp. 205-219, 10.1111/imr.12897
104. **Paces J, Strizova Z, Smrz D, Cerny J. 2020.** COVID-19 and the immune system. *Physiol Res.*;69(3):379-88.
105. **Padilla-Rojas C, Vega-Chozo K, Galarza-Perez M, Bailon Calderon H, Lope-Pari P, Balbuena-Torres J, Garcia Neyra D, Huaranga-Nuñez M, Rojas-Serrano N, Caceres-Rey O. 2020.** Genomic analysis reveals local transmission of SARS-CoV-2 in early pandemic phase in Peru. *bioRxiv*; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.05.284604>
106. **Paraskevis D, Kostaki E, Magiorkinis G, Panayiotakopoulos G, Sourvinos G, Tsiodras S. 2020.** Full-genome evolutionary analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infection, Genetics and Evolution*, 79, 104212
107. **Pardon E et al., 2014.** A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nature Protocols.* 9 (3), 674-693.

108. **Pedersen N, Liu H, Dodd K, Pesavento P. 2009.** Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis. *Virus Res.* 1: 166–184. Doi: 10.3390/v1020166
109. **Pérez-Abeledo M, J.C. Sanz Moreno. 2021.** Variantes de SARS-CoV-2, una historia todavía inacabada. *Vacunas*, Volume 22, Issue 3, Pages 173-179, ISSN 1576-9887, <https://doi.org/10.1016/j.vacun.2021.06.003>.
110. **Pérez-Rivera C, Ramírez-Mendoza H, Mendoza-Elvira S, Segura-Velázquez R, & Sánchez-Betancourt J I. 2019.** First report and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Mexico. *Transboundary and emerging diseases*, 66(4), 1436–1441.
111. **PHE. GOV.UK 2021.** Investigation of SARS-CoV-2 variants of concern: technical briefings [Internet] [26 noviembre 2023]. Disponible: <https://www.gov.uk/government/publications/investigation-of-novelsars-cov-2-variant-variant-of-concern-20201201>
112. **Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, et al. 2021.** Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature.*;596:276–280. doi: 10.1038/s41586-021-03777-9.
113. **Promptchara E, Ketloy C, Palaga T. 2020.** Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol.*;38(1):1-9. doi: 10.12932/AP-200220-0772. PMID: 32105090.
114. **Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Muller MA, Dijkman R, Muth D, Demmers JAA, Zaki A, Fouchier RAM, Thiel V, Drosten C, Rottier PJM, Osterhaus ADME, Bosch BJ, Haagmans BL. 2013.** Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, 495 (7440), 251-254.
115. **Ravichandran S, Coyle EM, Klenow L, Tang J, Grubbs G, Liu S, Wang T, Golding H, Khurana S. 2020.** Antibody signature induced by SARS-CoV-2 spike protein immunogens in rabbits. *Sci Transl Med.* Jul 1;12(550)
116. **Reyes JZ, Manchego AS, Castro GS, Burga CC, Pezo DC, Sandoval NC, Ramirez MV, Rivera HG. 2017.** Expresión de los Genes de Inmunoglobulina A y Citoquinas Asociadas IL-5, IL-6 y TGF-β en Mucosa Intestinal de Crías de Alpacas

(Vicugna pacos) Vacunadas con Antígeno Clostridial. *Rev Inv Vet Perú* 2017; 28(3): 703-712

117. **Röltgen, K. & Boyd, S.D. 2021.** Antibody and B cell responses to SARS-CoV-2 infection and 723 vaccination. *Cell Host & Microbe* 29, 1063-1075
118. **Saberiyann M, Karimi E, Khademi Z, Movahhed P, Safi A. 2022.** SARS-CoV-2: phenotype, genotype, and characterization of different variants. *Cell Mol Biol Lett* 27, 50.
119. **Saif Linda J. 2010.** Bovine respiratory coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*;26(2):349-64. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.005
120. **Seemann T, Lane CR, Sherry NL, Duchene S, Gonçalves da Silva A, Caly L, Sait M, Ballard SA, Horan K, Schultz MB. 2020.** Tracking the COVID-19 pandemic in Australia using genomics. *Nat. Commun.*;11:4376.
121. **Sette A, Crotty S. 2021.** Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.*;184(4):861-80.
122. **Shi P, Su Y, Li R, Liang Z, Dong S, Huang J. 2019.** PEDV nsp16 negatively regulates innate immunity to promote viral proliferation. *Virus Res.*;265:57-66.
123. **Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, Zhu H, Zhao W, Han Y, Qin C. 2019.** From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses*, 11 (1),59.
124. **Sternberg A, Naujokat C. 2020.** Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for a vaccination, *Life Sciences*. Sep 15; 257:118056.
125. **Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, Van Xong H, Wyns L, Senter P, Revets H, De Baetselier P, Muyltermans S, Magez S. 2004.** Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem* 279:1256-1261.b
126. **Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai CK, Zhou J, Liu W, Bi Y, Gao GF. 2016.** Epidemiology, genetic recombination and pathogenesis of coronaviruses. *Trends in Microbiology* 24, 490–502.

127. **Taştan C, Yurtsever B, Sir Karakuş G, Dilek Kançaği D, Demir S, Abanuz S, Seyis U, Yildirim M, Kuzay R, Elbol Ö, Arbak S, Açikel Elmas M, Bırdoğan S, Sezerman OU, Kocagöz AS, Yalçın K, Ovali E. 2020.** SARS-CoV-2 isolation and propagation from Turkish COVID-19 patients. *Turk J Biol.*;44(3):192-202. doi: 10.3906/biy-2004-113.
128. **Tay MZ, Poh CM, Renia L, MacAry PA, Ng LFP. 2020.** The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.*;20(6):363-74.
129. **te Velthuis AJW, Arnold JJ, Cameron CE, van den Worm SHE, Snijder EJ. 2010.** The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res.*;38(1):203-214
130. **te Velthuis AJ, van den Worm SH, Snijder EJ. 2012.** The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. *Nucleic Acids Res.*;40(4):1737-1747.
131. **Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, et al. 2021.** Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nat.* 2021;5927854(592):438–443. doi: 10.1038/s41586-021-03402-9.
132. **Thoms M, Buschauer R, Ameisemeier M, Koepke L, Denk T, Hirschenberger M, et al. 2020.** Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science.*;369(6508):1249-55. doi: 10.1126/science.abc8665.
133. **Tian X, Li C, Huang A, Xia S, Lu S, Shi Z, et al. 2020.** Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg Microbes Infect.*;9(1):382–385. doi: 10.1080/22221751.2020.1729069. 23. Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2006;66:193–292.
134. **Van der Linden, R., B. de Geus, W. Stok, W. Bos, D. van Wassenaar, T. Verrips, and L. Frenken, 2000.** Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J. Immunol. Meth.* 240, 185±195

135. **Victorio W.** 2004. Seroprevalencia de los virus neumopatogenos de la parainfluenza bovina 3 (VPI3), Herpesvirus bovino 1 (HVB1) y Virus respiratorio Sincitial Bovino (VRSB) en alpacas adultas de la provincia de Canchis, Cusco.
136. **Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyltermans S.** 1997. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Molecular Immunology*, Vol. 34, No. 16-17, 1121-1131.
137. **Wang X, Xia S, Wang Q, Xu W, Li W, Lu L, Jiang S.** 2020. Broad-Spectrum Coronavirus Fusion Inhibitors to Combat COVID-19 and Other Emerging Coronavirus Diseases. *Int J Mol Sci*;21(11):3843. doi: 10.3390/ijms21113843.
138. **Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS. & Li F** 2020. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* 94, e00127-20.
139. **Wang Q, Vlasova A N, Kenney SP, & Saif L J.** 2019. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Current opinion in virology*, 34, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.001>
140. **Wernery U,** 2001. Camelid Immunoglobulins and Their Importance for the New-Born. A Review. *J. vet. Med. B* 48 48, 561-568
141. **Wesolowski J et al.,** 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology.* 198 (3), 157-174, (2009).
142. **Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY.** 2009. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)*;234(10):1117-27. doi: 10.3181/0903-MR-94. Epub 2009 Jun 22. PMID: 19546349.
143. **Wrapp D, De Vlieger D, Corbett KS, Torres GM, Wang N, Van Breedam W, Roose K, van Schie L; VIB-CMB COVID-19 Response Team; Hoffmann M, Pöhlmann S, Graham BS, Callewaert N, Schepens B, Saelens X, McLellan JS.** 2020. Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies. *Cell.* May 28;181(5):1004-1015.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.031.

144. **Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, et al. 2020.** Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 367(6483):1260–1263.
145. **Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou JJ, Li N, Guo Y, Li X, Shen X, et al. 2020.** Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature* 583, 286–289.
146. **Xiaojie S, Yu L, Lei Y, Guang Y, Min Q. 2021.** Neutralizing antibodies targeting SARS-CoV-2 spike protein. *Stem Cell Res.* 2021 Dec 15;50:102125. doi: 10.1016/j.scr.2020.102125.
147. **Yang YL, Yu JQ, & Huang YW. 2020.** Swine enteric alphacoronavirus (swine acute diarrhea syndrome coronavirus): An update three years after its discovery. *Virus research*, 285, 198024
148. **Yoshimoto FK. 2020.** The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J.*;39(3):198-216. doi: 10.1007/s10930-020-09901-4. PMID: 32447571; PMCID: PMC7245191.
149. **Zeng Z, Deng F, Shi K, et al. 2018.** Dimerization of coronavirus nsp9 with diverse modes enhances its nucleic acid binding affinity. *J Virol.*; 92(17):e00692-18.
150. **Zhai Y, Sun F, Li X, et al. 2005.** Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat Struct Mol Biol.*;12(11):980-986
151. **Zhang Z, Zheng Y, Niu Z, Zhang B, Wang C, Yao X, et al. 2021.** SARS-CoV-2 spike protein dictates syncytium-mediated lymphocyte elimination. *Cell Death Differ.*;28(9):2765-77. doi: 10.1038/s41418-021-00782-3
152. **Zhao X, Chen H, Wang H. 2021.** Glycans of SARS-CoV-2 Spike Protein in Virus Infection and Antibody Production. *Front Mol Biosci* 8, 629873.
153. **Zhou D, Dejnirattisai W, Supasa P, et al. 2021.** Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell.*;184:2348–2361.e6. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.037

154. **Zhou H, Fang Y, Xu T, Ni WJ, Shen AZ, Meng XM, 2020.** Potential therapeutic targets and promising drugs for combating SARS-CoV-2. *Br J Pharmacol* 177(14):3147-3161
155. **Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL. 2020.** A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273.
156. **Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W and China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. 2020.** A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal Medicine*, 382, 727–733.

## ANEXOS

### Anexo 2. Prueba de Kruskal Wallis y *post hoc* en R.

```
> kruskal.test(valor ~ Tratamiento, data = datos)

      kruskal-wallis rank sum test

data:  valor by Tratamiento
kruskal-wallis chi-squared = 32.388, df = 6, p-value = 1.375e-05

>
> str(datos)
'data.frame':  35 obs. of  2 variables:
 $ Tratamiento: chr  "alfa" "alfa" "alfa" "alfa" ...
 $ valor      : int  8 8 8 8 8 7 7 5 5 4 ...
>

> pairwise.wilcox.test(datos$valor, datos$Tratamiento)

      Pairwise comparisons using wilcoxon rank sum test with continuity correction

data:  datos$valor and datos$Tratamiento

      alfa  beta  cov alpaca delta SARS COV suero
beta    0.098 -    -    -    -    -    -
cov alpaca 0.076 0.098 -    -    -    -
delta    0.098 0.098 0.098 -    -    -
SARS COV -    0.098 0.076 0.098 -    -
suero    0.076 0.098 -    0.098 0.076 -
wuhan    0.098 0.098 0.098 0.488 0.098 0.098

P value adjustment method: holm
```

## DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

Nosotros, miembros del jurado examinador, por la presente hacemos constar que hemos evaluado el trabajo de investigación titulado “ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS IgG DE ALPACAS CONTRA ANTÍGENOS DE LA PROTEÍNA S DE LAS VARIANTES ALFA, BETA Y DELTA DE SARS-CoV-2 Y CORONAVIRUS DE ALPACA” presentado por la Bachiller en Medicina Veterinaria MARÍA SAMANTHA RODRÍGUEZ HUAMÁN.

Durante el proceso de revisión, a pesar que el trabajo de investigación indica que “el manejo de los animales se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido en la Autorización No 2009-001 del Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos”, se ha evidenciado que el estudio experimental en animales descrito en este trabajo no contó con la aprobación previa de un comité de ética competente, tal como lo requieren las normativas y estándares internacionales y nacionales para la investigación con animales (RESOLUCIÓN PRESIDENCIAL N° 028-2024-CONCYTEC-P y Ley Nro. 30407 del congreso de la Republica).

Es importante destacar que, aunque el contenido científico del estudio ha sido evaluado y considerado en términos de sus méritos académicos, los procedimientos experimentales realizados siguieron parcialmente las directrices éticas establecidas para la protección y bienestar de los animales utilizados en la investigación y el protocolo de investigación aplicado no fue completamente evaluado por un comité de ética.

La falta de aprobación ética puede implicar serias consideraciones éticas y legales, y este jurado desapruueba enfáticamente la realización de estudios experimentales en animales sin la debida revisión y aprobación ética. Recomendamos que se tomen las medidas necesarias para asegurar que futuras investigaciones cumplan rigurosamente con todos los requisitos éticos pertinentes.

Este descargo de responsabilidad tiene como objetivo dejar constancia de nuestra inconformidad respecto a la ausencia de un protocolo ético aprobado que incluya todos los procedimientos a realizarse en la investigación y subrayar la importancia de adherirse a los más altos estándares éticos en la investigación científica.



MV. Mg. GÓMEZ PUERTA LUIS ANTONIO  
Presidente del Jurado



MV. Dr. GONZALES GUSTAVSON ELOY ANIBAL  
Miembro del Jurado



MV, PhD. MORE BAYONA JUAN ANDERSON  
Miembro del Jurado