

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS DE LA SALUD



**“Características de la proteína S del virus SARS-CoV-2
y las implicaciones clínicas en pacientes del Hospital
Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham
Casasús” durante la pandemia 2020-2022”**

**Tesis para obtener el grado de
Doctorado en Ciencias Biomédicas**

Presenta:

M. en C. Guadalupe del Carmen Baeza Flores

Directores:

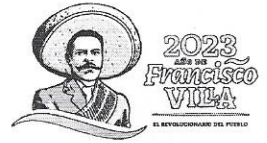
Dr. en C. Jesús Miguel Magaña Cerino
Dr. en C. Juan Pedro Luna Arias

Asesora:

Dra. en C. Mirian Carolina Martínez López

Villahermosa, Tabasco.

Octubre 2023.



Villahermosa, Tabasco, 10 de agosto de 2023

Of. No. 0657/DACS/JI

ASUNTO: Autorización de impresión de tesis

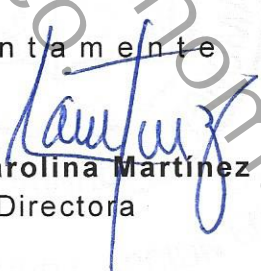
C. Guadalupe del Carmen Baeza Flores

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Presente

Comunico a Usted, que autorizo la impresión de la tesis titulada **"Características de la proteína S del virus SARS-CoV-2 y las implicaciones clínicas en pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús" durante la pandemia 2020-2022"**., con índice de similitud 7% y registro del proyecto No. **JI-PG-155**; previamente revisada y aprobada por el Comité Sinodal, integrado por los profesores investigadores Dra. Mirian Carolina Martínez López, Dr. Xavier Miguel Boldo León, Dra. Julia María Leshher Gordillo, Dra. Thelma Beatriz González Castro, Dr. Jesús Miguel Magaña Cerino, Dra. Crystell Guadalupe Guzmán Priego y Dra. Viridiana Olvera Hernández, Lo anterior para sustentar su trabajo recepcional del **Doctorado en Ciencias Biomédicas**, donde fungen como Directores de Tesis: el Dr. en C. Jesús Miguel Magaña Cerino y el Dr. en C. Juan Pablo Luna Arias.

Atentamente

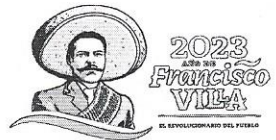

Dra. Mirian Carolina Martínez López
Directora

UJAT



DACS
DIRECCIÓN

- C.c.p.- Dr. En C. Jesús Miguel Magaña Cerino.- Director de tesis
- C.c.p.- Dr. En C. Juan Pablo Luna Arias.- Director de Tesis
- C.c.p.- Dra. Mirian Carolina Martínez López.- Sinodal
- C.c.p.- Dr. Xavier Miguel Boldo León.- Sinodal
- C.c.p.- Dra. Julia María Leshher Gordillo.- Sinodal
- C.c.p.- Dra. Thelma Beariz González Castro.- Sinodal
- C.c.p.- Dr. Jesús Miguel Magaña Cerino.- Sinodal
- C.c.p.- Dra. Crystell Guadalupe Guzmán priego.- Sinodal
- C.c.p.- Dra. Viridiana Olvera Hernández.- Sinodal
- C.c.p.- Archivo
- DC' MCML/DC' OGMF/lkrd*



ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de Villahermosa Tabasco, siendo las 09:00 horas del día 08 del mes de agosto de 2023 se reunieron los miembros del Comité Sinodal (Art. 71 Núm. III Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente) de la División Académica de Ciencias de la Salud para examinar la tesis de grado titulada:

"Características de la proteína S del virus SARS-CoV-2 y las implicaciones clínicas en pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús" durante la pandemia 2020-2022".

Presentada por el alumno (a):

Baeza Flores Guadalupe del Carmen

Apellido Paterno Materno Nombre (s)

Con Matricula

2	0	1	E	6	2	0	0	4
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al Grado de:

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS** en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

COMITÉ SINODAL

Dr. en C. Jesús Miguel Magaña Cerino

Dr. en C. Juan Pedro Luna Arias

Directores de Tesis

Dra. Mirian Carolina Martínez López

Dr. Xavier Miguel Boldo León

Dra. Julia María Leshner Gordillo

Dra. Thelma Beatriz González Castro

Dr. Jesús Miguel Magaña Cerino

Dra. Crystel Guadalupe Guzmán Priego

Dra. Viridiana Olvera Hernández

Carta de Cesión de Derechos

En la ciudad de Villahermosa Tabasco el día 31 del mes de Julio del año 2023, el que suscribe, Guadalupe del Carmen Baeza Flores, alumno del programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas, con número de matrícula 201E62004 adscrito a la División Académica de Ciencias de la Salud, manifiesta que es autor intelectual del trabajo de tesis titulada: **“Características de la proteína S del virus SARS-CoV-2 y las implicaciones clínicas en pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” durante la pandemia 2020-2022”**, bajo la Dirección del Dr. Jesús Miguel Magaña Cerino y del Dr. Juan Pedro Luna Arias. Conforme al Reglamento del Sistema Bibliotecario Capítulo VI Artículo 31, el alumno cede los derechos del trabajo a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficos o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo, el que puede ser obtenido a la dirección: ba_lupitabaeza@hotmail.com. Si el permiso se otorga el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


M. en C. Guadalupe del Carmen Baeza Flores





AGRADECIMIENTOS

Al recordar que este proyecto nació en medio de una tempestad, el resultado me hace sentir muy orgullosa y sólo se me ocurre la palabra: ¡Gracias!

Gracias Dios por dame la oportunidad de alcanzar esta meta y por hacerme coincidir con las personas correctas.

A la Dra. Mirian Carolina Martínez López, al Dr. Jesús Miguel Magaña Cerino y al Dr. Juan Pedro Luna Arias ya que todo fue posible gracias a su apoyo incondicional. También quiero mostrar mi agradecimiento a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco que me abrió las puertas y me permitió formar parte de un gran equipo.

Al Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” por la oportunidad de crecimiento y aprendizaje, particularmente al Dr. Jesús Arturo Ruiz Quiñones por su soporte y a todos los integrantes del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales y Emergentes (CIETE) por su compañerismo.

A los integrantes de la Unidad de Secuenciación USec del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

A mi familia y amigos que estuvieron siempre presentes.

A la Dra. Crystell Guadalupe Guzmán Priego, al Dr. Xavier Miguel Boldo León, a la Dra. Ángela Ávila Fernández, al Dr. Jorge Elías Torres López, a la Dra. Viridiana Olvera Hernández, de quienes valoro tanto sus consejos y sabiduría.



DEDICATORIAS

Esta tesis, resultado de mucho esfuerzo se las dedico con todo mi amor y cariño.

A mis Padres y hermanos por su amor incondicional.

A Daniel por su amor y paciencia.

A mis Profesores por su compromiso.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIAS	II
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
GLOSARIO	X
ABREVIATURAS	XII
INTRODUCCIÓN	14
ESTRUCTURA GENÓMICA DEL SARS-CoV-2	15
PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES	16
PROTEÍNAS ESTRUCTURALES	18
PROTEÍNA DE NUCLEOCÁPSIDE (N)	18
PROTEÍNA DE MEMBRANA (M) Y ENVOLTURA (E)	18
LA PROTEÍNA ESPIGA (S)	19
ENTRADA DEL CORONAVIRUS A LA CÉLULA HOSPEDERA	23
VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA	25
VARIANTES DE SARS-CoV-2	26
ANTECEDENTES	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
JUSTIFICACIÓN	35
OBJETIVOS	36
OBJETIVO GENERAL	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
MATERIAL Y MÉTODOS	37
CONSIDERACIONES ÉTICAS	37
SUJETOS	37
FLUJO DE TRABAJO	39
EXUDADO NASO/FARÍNGEO	39
EXTRACCIÓN DEL RNA VIRAL	41
DETECCIÓN DE SARS-COV-2	41
SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)	43
ANÁLISIS DE DATOS	44



RESULTADOS.....	46
CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON COVID-19	46
ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DEL GEN S DEL VIRUS SARS-CoV-2 PROVENIENTES DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON COVID-19.....	52
RELACIÓN DE VARIANTES CIRCULANTES DE SARS-CoV-2 CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	85
DISCUSIÓN.....	91
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON COVID- 19.....	91
ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA S DEL VIRUS SARS-CoV-2.....	93
RELACIÓN DE LAS VARIANTES CIRCULANTES DE SARS-CoV-2 Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	111
CONCLUSIONES.....	113
PERSPECTIVAS.....	115
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116



Índice de figuras

Figura 1. Información estructural de SARS-CoV-2	16
Figura 2. Proteína S y sus interacciones con el receptor ACE2	22
Figura 3. Ciclo de vida de SARS-CoV-2	25
Figura 4. Mutaciones de SARS-CoV-2.....	29
Figura 5. Diseño experimental	39
Figura 6. Técnica para la obtención de muestra nasofaríngea.....	40
Figura 7. Descripción general del diagnóstico de COVID-19 por RT-PCR.....	42
Figura 8. Determinación de la secuencia genómica de SARS-CoV-2 por NGS	44
Figura 9. Distribución por grupo de edad y sexo.....	46
Figura 10. Distribución geográfica de casos de SARS-CoV-2.....	47
Figura 11. Manifestaciones clínicas de los pacientes con COVID-19 del Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús"	48
Figura 12. Enfermedades coexistentes de los pacientes con COVID-19 del Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús.....	49
Figura 13. Días de estancia intrahospitalaria (DEIH) por motivo de egreso.....	51
Figura 14. Frecuencia de mutaciones de la proteína S	53
Figura 15. Mutaciones en la secuencia de la proteína S distribuida por clado.	56
Figura 16. Estructura tridimensional de la proteína S.....	58
Figura 17. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 20A.....	60
Figura 18. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 20B.....	62
Figura 19. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 20C.....	64
Figura 20. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 20G.....	66
Figura 21. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 20I Alpha.....	68
Figura 22. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 20J Gamma	70
Figura 23. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 21C Épsilon	72
Figura 24. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 21G Lambda.....	74
Figura 25. Comparación de la estructura tridimensional de proteína S (Wuhan) vs el Clado 21I Delta.....	76
Figura 26. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 21J Delta.....	78
Figura 27. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 21K Ómicron.....	82



Figura 28. Mutaciones de los clados circulantes identificadas en muestras hospitalarias.....	83
Figura 29. Distribución de clados a través del tiempo en pacientes hospitalizados en Tabasco	84
Figura 30. Media de edad por clados de SARS-CoV-2	85
Figura 31. Distribución de clados de SARS-CoV-2 por sexo	86
Figura 32. Distribución de clados de SARS-CoV-2 por gravedad de la enfermedad	90

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de proteínas no estructurales.....	17
Tabla 2. Dominios funcionales de la proteína S	20
Tabla 3. Canales de fluorescencia para la detección de SARS-CoV-2.....	41
Tabla 4. Concentraciones séricas evaluadas al ingreso de los pacientes con COVID-19	50
Tabla 5. Clados circulantes de SARS-CoV-2 en pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”	52
Tabla 6. Media de mutaciones de la proteína S por clado.....	54
Tabla 7. Distribución de mutaciones por región del genoma de la proteína S.	55
Tabla 8. Mutaciones en la secuencia de la proteína S distribuida por clados	57
Tabla 9. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 20A.....	59
Tabla 10. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 20B.....	61
Tabla 11. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 20C	63
Tabla 12. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 20G	65
Tabla 13. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 20I Alpha	67
Tabla 14. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 20J Gamma.....	69
Tabla 15. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 21C Épsilon	71
Tabla 16. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 21G Lambda	73
Tabla 17. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 21I Delta.....	75
Tabla 18. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 21J Delta	77
Tabla 19. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 21K Ómicron	79
Tabla 20. Características clínicas de los pacientes de acuerdo con clados circulantes de SARS-CoV-2.....	87
Tabla 21. Síntomas y comorbilidades por clado circulante de SARS-CoV-2	89



RESUMEN

Título: Características de la proteína S del virus SARS-CoV-2 y las implicaciones clínicas en pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” durante la pandemia 2020-2022.

Introducción: El SARS-CoV-2 representa la causa de morbimortalidad más importante a nivel mundial durante los últimos años. Está formado por 4 proteínas. De importancia para nuestro estudio, la proteína S que cumple la función de reconocer al receptor ACE2 humanos para la entrada viral.

Objetivo: Determinar las características de la proteína S del virus SARS-CoV-2 y las implicaciones clínicas en pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” con la gravedad de la enfermedad durante la pandemia 2020-2022.

Material y métodos: Se analizó una muestra no probabilística de 200 pacientes mayores de 18 años, con resultado positivo a SARS-CoV-2 procedentes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”. Los datos clínicos de los pacientes se extrajeron al ingreso hospitalario. La extracción de RNA viral se realizó mediante el equipo automatizado iPrep™ PureLink® Virus Kit (INVITROGEN®). La detección de SARS-CoV-2 se realizó en el equipo de PCR en tiempo real QuantStudio5™ Real-Time PCR (Applied Biosystems), y la amplificación fue realizada usando GeneFinder™ COVID19 Real Amp Kit v2 (Cat IFMR-45) (OSANG Healthcare Co., Lt.).

Los datos se analizaron a través de medidas de tendencia central y dispersión, se utilizaron pruebas de hipótesis de acuerdo con la naturaleza de las variables. El genoma de los virus se secuenció con kits IlluminaMiSeq 500v2 [Illumina, San Diego, CA, EE. UU.]

Resultados: Todas las secuencias analizadas de pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”, se clasificaron a través de clados, el 26.9% (n=53) pertenece al clado 21K (Ómicron), el 27.4% (n=54) al 20B, el 19.8% (n=39) al 20A. La media fue 10.7 ± 11.2 sustituciones, con un mínimo de 1 y máximo de 32, obteniendo un total de 121 mutaciones

Conclusiones: Durante el periodo de pandemia 2020-2022 circularon 11 clados de SARS-CoV-2 que tuvieron por lo menos la mutación D614G, el clado 21K Ómicron posee la mayor cantidad de mutaciones. Las sustituciones de aminoácidos en la región N-terminal y del dominio de unión con el receptor ACE2 son altamente frecuentes.

Palabras Clave: SARS-CoV-2; COVID-19; Proteína S; mutaciones; clados;



ABSTRACT

Title: Features of the S protein of the SARS-CoV-2 virus and clinical implications in patients of the Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús" during the 2020-2022 pandemic.

Background: SARS-CoV-2 represents the most important cause of morbidity and mortality worldwide in recent years. It is made up of 4 structural proteins. Of importance to our study, the S protein that recognizes the human ACE2 receptor for viral entry.

Aim: To determine the characteristics of the S protein of the SARS-CoV-2 virus and the clinical implications in patients of the Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús" with the severity of the disease during the 2020-2022 pandemic.

Methods: A non-probabilistic sample of 200 patients over 18 years of age was analyzed, with a positive result for SARS-CoV-2 from the Regional High Specialty Hospital "Dr. Juan Graham Casasús". The clinical data of the patients were extracted upon hospital admission. Viral RNA extraction was performed using the iPrep™ PureLink® Virus Kit (INVITROGEN®) automated equipment. SARS-CoV-2 detection was performed using the QuantStudio5™ Real-Time PCR (Applied Biosystems) real-time PCR equipment. and amplification was performed using GeneFinder™ COVID19 Real Amp Kit v2 (Cat IFMR-45) (OSANG Healthcare Co., Ltd.).

The data was analyzed through measures of central tendency and dispersion, hypothesis tests were used according to the nature of the variables. Virus genomes were sequenced with Illumina MiSeq 500v2 kits (Nextera DNA Flex Library Prep Kit and MiSeq V2 Reagent Cartridge [Illumina, San Diego, CA, USA])

Results: All the sequences analyzed from patients of the Regional High Specialty Hospital "Dr. Juan Graham Casasús", are classified through clades, 26.9% (n=53) belong to clade 21K (Ómicron), 27.4% (n=54) to 20B, 19.8% (n=39) at 20A. The mean was 10.7 ± 11.2 substitutions, with a minimum of 1 and a maximum of 32, obtaining a total of 121 mutations

Conclusions: 11 clades of SARS-CoV-2 circulated that had at least the D614G mutation, the 21K Omicron clade has the largest number of affected people. Amino acid substitutions in the N-terminal region and in the ACE2 receptor binding domain are very common.

Key words: SARS-COV-2; COVID-19; Spike protein; mutations, clades



GLOSARIO

Clado	Grupo de organismos relacionados que comparten un determinado material genético
Dominio	Parte de una proteína que cumple una función independiente del resto de la proteína
Genoma	Conjunto de los cromosomas presentes en la célula y, por tanto, su información genética completa
Linaje	Un linaje es un grupo de virus estrechamente relacionados con un ancestro común
Morbilidad	Cantidad de personas enfermas en relación con una población específica
Mortalidad	Cantidad de muertes en una población
Mutación	Variación permanente de la estructura genética en la que la progenie difiere de los progenitores
Neumonía	Enfermedad infecciosa que se caracteriza por la inflamación de los pulmones
Nucleótido	Compuesto formado por ácido fosfórico, una pentosa y una base que constituyen la unidad estructural del ácido nucleico
Proteasa	Tipo de enzima que rompen, o hidrolizan, las uniones peptídicas que unen los aminoácidos en una proteína. La proteína se rompe en sus constituyentes básicos
Proteína	Compuesto complejo que se sintetiza en todos los seres vivos
Receptor	Estructura ubicada en la membrana celular o en el interior de la célula que se combina con un fármaco, una hormona, una sustancia química intermediaria o un agente infeccioso y altera algún aspecto del funcionamiento de dicha célula



Variante

Diferencia entre los microorganismos o las entidades en una clasificación concreta.

Virus

Patógeno hecho de ácido nucleico en una envoltura proteica que solo puede crecer y reproducirse después de infectar una célula huésped

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ACE2	Enzima convertidora de Angiotensina 2
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
FP	Péptido de fusión
HR1	Heptada repetida 1
HR2	Heptada repetida 2
KDa	Kilodalton
MERS-CoV	Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio
NGS	Secuencia de nueva generación
nm	Nanómetros
NSP	Proteínas no estructurales
NTD	Dominio N-terminal
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Proteína C Reactiva
RBD	Dominio de unión al receptor
RTC	Complejo Replicasa Transcriptasa
RT-PCR	Transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
S1	Subunidad S1
S2	Subunidad S2



SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
TM	Dominio transmembrana
TMRPSS2	Serina proteasa transmembrana de tipo 2
VOC	Variante de preocupación
VOI	Variante de interés

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



INTRODUCCIÓN

LA ENFERMEDAD DE LA COVID-19

A finales de 2019, se identificó por primera vez el virus SARS-CoV-2 (del inglés *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), agente etiológico de la enfermedad de la COVID-19 (del inglés, *Coronavirus Disease 2019*) en un grupo de pacientes con conexiones en Huanan, Wuhan, provincia de Hubei, China (Lu *et al.*, 2020).

El virus SARS-CoV-2 es el tercer coronavirus humano zoonótico, que se propagó con rapidez a través del contacto con aerosoles, y desde entonces se consideró la causa de morbilidad más importante a nivel mundial de los últimos años (Gralinski & Menachery, 2020). El virus SARS-CoV-2 tiene una secuencia genética similar a los virus MERS-CoV (del Inglés *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) y SARS-CoV (del Inglés *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) (Hasöksüz *et al.*, 2020); morfológicamente, son de forma esférica, de aproximadamente 125 nm de diámetro, con picos que se proyectan desde la superficie del virus que le dan la apariencia de una corona (Malik, 2020). El virus contiene cuatro proteínas estructurales que incluyen nucleocápside (N), membrana (M), envoltura (E), y de importancia para nuestro estudio, la proteína espiga (del inglés *Spike* (S)).

En cuanto a las manifestaciones clínicas, la infección por SARS-CoV-2 se describió con la aparición de fiebre, tos, expectoración, dolor de garganta, disnea, dolor muscular, dolor de cabeza, dolor en el pecho/tórax, diarrea, náuseas y vómito, además



de un recuento bajo de leucocitos(leucopenia), recuento bajo de linfocitos (linfopenia) y elevación de proteína C reactiva (PCR) (Yang *et al.*, 2020). Con respecto a la gravedad de la enfermedad, incluye un amplio abanico de presentaciones que van desde la enfermedad asintomática/leve, hasta la enfermedad crítica e incluso la muerte (World Health Organization, 2020).

El diagnóstico confirmatorio de SARS-CoV-2 se realiza a través de la detección de uno de los objetivos moleculares del virus a través de la transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). Destaca el papel de la vigilancia genómica, la cual ha sido fundamental para establecer los mecanismos de entrada del virus, las interacciones moleculares con el huésped, y el diagnóstico además del monitoreo de nuevas cepas desde las primeras etapas de la pandemia de COVID-19 en apoyo de los métodos epidemiológicos tradicionales (Nasir *et al.*, 2022).

ESTRUCTURA GENÓMICA DEL SARS-COV-2

El SARS-CoV-2 es un virus de RNA monocatenario de sentido positivo, que pertenece al género *Betacoronavirus* de la familia *Coronaviridae*, Subfamilia *Orthocoronavirinae*, orden *Nidovirales*, reino *Riboviria* (Kirtipal *et al.*, 2020). Su genoma está constituido por 29,903 nucleótidos y codifica 9860 aminoácidos (Figura 1). El virus contiene cuatro proteínas estructurales, la proteína espiga (Proteína S) de 3,822 pb, la proteína de membrana (M) con 669 pb, de envoltura (E) constituida por 228 pb, y de nucleocápside (N) de 908 pb, además de 9 proteínas accesorias y 16 proteínas no estructurales (Elrashdy *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2021; Shaibu *et al.*, 2021).

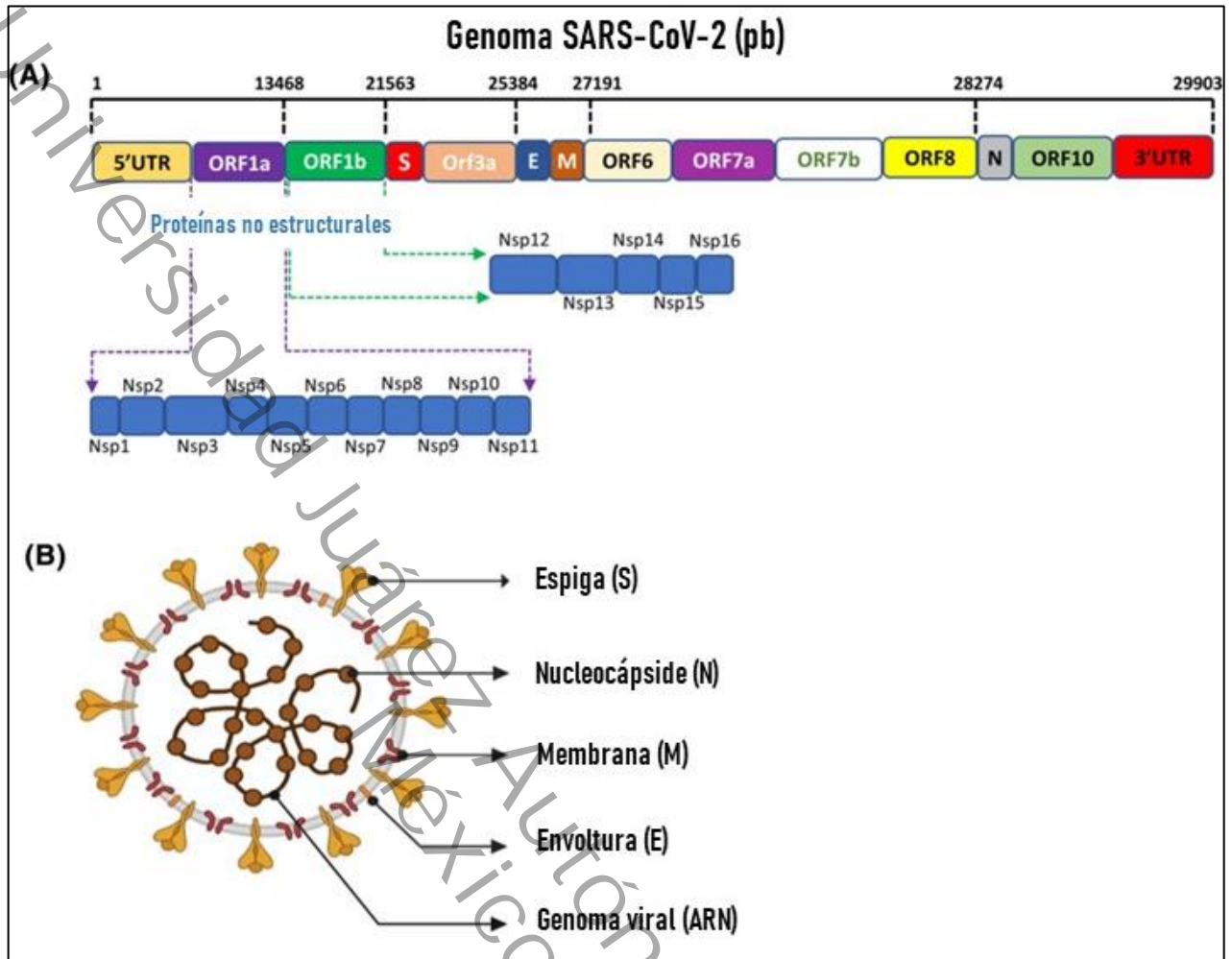


Figura 1. Información estructural de SARS-CoV-2

La organización estructural del genoma de SARS-CoV-2. El panel A, se muestra la representación esquemática de la organización del genoma de SARS-CoV-2 en pb. El panel B, la descripción de la estructura de SARS-CoV-2, donde se señala el material genético, las cuatro proteínas estructurales y la envoltura lipídica de doble capa que lo rodea. Editado de (Gupta *et al.*, 2021).

PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

En el virus SARS-CoV-2, los primeros dos tercios del genoma contiene los genes de la replicasa, formada por los genes que codifican las poliproteínas 1a (pp1a) y 1ab (pp1ab). La poliproteína pp1a se escinde en once proteínas no estructurales (Nsp1-11) y la pp1ab contiene las primeras proteínas junto con cinco adicionales (Nsp12-16)



que realizan funciones en la replicación viral, la transcripción, la modulación y la resistencia a la respuesta antiviral innata (Tabla 1) (Daniels *et al.*, 2021; Dorlass *et al.*, 2021; O'Leary *et al.*, 2020).

Tabla 1. Descripción de proteínas no estructurales

Proteína	Tamaño	Función
Nsp1	19.6 kDa; 180 aa	Bloquea el sitio de entrada ribosómico para evitar la unión del ARNm del huésped
Nsp2	70.5 kDa; 639 aa	
Nsp3	217 kDa; 1946 aa	Es el elemento más grande del complejo de replicación transcripción (RTC). Interfiere con la producción de interferones necesarios dentro del sistema inmune del huésped e interactúa con la proteína N
Nsp4	56 kDa; 501 aa	Forma complejos con Nsp3 y Nsp6 para el ensamblaje de vesículas dentro de las que se produce la replicación viral
Nsp5	33.7 kDa; 307 aa	Es una proteinasa, interviene en la escisión en once sitios distintos
Nsp6	33 kDa; 291 aa	Se ubica en el retículo endoplásmico y genera autofagosomas que son responsables de la entrega de contenido citoplásmico a los lisosomas
Nsp7	9.2 kDa; 84 aa	Complejo que actúa como primasa para Nsp12
Nsp8	21.8 kDa; 199 aa	
Nsp9	12.3 kDa; 114 aa	Se une al ARN monocatenario
Nsp10	14.7 kDa; 140 aa	Proteína similar al factor de crecimiento que estuila las actividades de metiltransferasa de Nsp16. Camufla al ARN viral del sistema inmune del huésped
Nsp11	1.3 kDa; 13 aa	Se desconoce la función
Nsp12	106.6 kDa; 932 aa	Representa la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP). Esencial del complejo de replicación y transcripción del virus
Nsp13	66.8 kDa; 601 aa	Sirve como helicasa para desenrollar el ARN del SARS-CoV-2



Proteína	Tamaño	Función
Nsp14	59.8 kDa; 527 aa	Exoribonucleasa.
Nsp15	38.8 kDa; 346 aa	EndoRNasa, degrada fragmentos de ARN viral
Nsp16	33.3 kDa; 298 aa	Metiltransferasa activado por Nsp10. Evade la detección de l sistema inmune del huésped

aa: aminoácidos. Recuperado y traducido de (Daniels *et al.*, 2021; O'Leary *et al.*, 2020).

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

PROTEÍNA DE NUCLEOCÁPSIDE (N)

La proteína nucleocápside (N) posee 419 aa y es una proteína estructural importante para el SARS-CoV-2. Después de la infección, la proteína N cumple con unirse y empaquetar el ARN viral en la ribonucleocápside helicoidal, además de interactuar con otras proteínas estructurales durante el ensamblaje de los viriones (Saikatendu *et al.*, 2007; W. Zeng *et al.*, 2020).

PROTEÍNA DE MEMBRANA (M) Y ENVOLTURA (E)

Las proteínas estructurales de membrana (M), y envoltura (E) poseen las secuencias señal de tráfico y se acumulan en el retículo endoplasmático. La incorporación eficiente de estas proteínas y el complejo ribonucleoproteico es esencial para la maduración de nuevas partículas de virión. Las proteínas M y E juegan un papel importante en la regulación de ensamblaje del virión.

La proteína M del SARS-CoV-2 es una glicoproteína transmembrana de tipo III de 222 aminoácidos de longitud y es la proteína estructural más abundante. Tiene 3



dominios principales: el ectodominio N-terminal seguido de tres hélices transmembrana (TMH1-TMH3) y el endodominio C-terminal (Mahtarin *et al.*, 2022).

La proteína E es la proteína estructural transmembrana más pequeña de 75 aminoácidos que comprende tres dominios: un ectodominio hidrofílico N-terminal, un dominio transmembrana hidrofóbico (TMD), seguido de un endodominio C-terminal hidrofílico largo.

LA PROTEÍNA ESPIGA (S)

La proteína espiga (S) es la principal proteína estructural y está incrustada en la membrana viral del SARS-CoV-2 en forma homotrimérica y cumple con la función de reconocer el receptor ACE2 humano, que permite la unión del virus y es la entrada del mismo a las células (Sun *et al.*, 2022). Se produce en el retículo endoplásmico rugoso de las células infectadas y tiene un tamaño de 180-200 kDa (Huang *et al.*, 2020; Li, 2016).

La longitud total de la proteína S es de 1,273 aminoácidos; consta de una péptido señal ubicada en el extremo N-terminal (aminoácidos 1-13), una subunidad S1 compuesta por 672 aminoácidos (residuos 14-685) que representa la parte variable de la proteína, y una subunidad S2 (aminoácidos 686-1273) mucho más conservada (Y. Huang *et al.*, 2020) (Tabla 2).



Tabla 2. Dominios funcionales de la proteína S

No.	Componentes funcionales	Posición de aminoácidos
1	Subunidad S1	14-685
1.2	Dominio N-terminal	14-305
1.3	Motivo de unión al receptor	437-508
1.4	Dominio de unión al receptor	319-541
2	Subunidad S2	686-1273
2.1	Péptido de fusión	788-806
2.2	Secuencia Heptada repetida 1	912-984
2.3	Secuencia Heptada repetida 2	1163-1213
2.4	Dominio Transmembrana	1214-1237
2.5	Dominio Citoplasmático	1238-1273

Tomado de (Satarker & Nampoothiri, 2020).

Los primeros 13 residuos de aminoácidos de la proteína S constituyen el péptido señal, necesario para guiar su transporte a su destino en la membrana (Gupta *et al.*, 2021), que corresponde al receptor ACE2 (Arya *et al.*, 2021). La subunidad S1 es la responsable del inicio de la infección viral, que consiste en la unión de las partículas virales a los receptores celulares en la superficie de la célula huésped (Figura 2) y en su estructura destaca un dominio N-terminal (NTD) y el dominio de unión (RBD). El NTD está dinámicamente relacionado con la adhesión a la célula del huésped (Klinakis *et al.*, 2021).

En el límite entre la subunidad S1 y S2 hay una región denominada sitio de escisión de la proteasa S1/S2, región que debe ser cortada por las proteasas del huésped para activar y facilitar la fusión y entrada del virus (Figura 2). La subunidad S2 a diferencia de la subunidad S1 es el responsable de la fusión de las membranas del virus y las células del huésped, y la entrada viral; estructuralmente está compuesta por un péptido de fusión (PF), dos regiones de siete aminoácidos (heptada) repetidos (HR1 y HR2), dominio transmembranal (TM), y una cola citoplasmática (CT) (Davies



et al., 2021; Li, 2016). El péptido de fusión (PF) es un segmento corto de 15 a 20 aminoácidos que desempeña un papel esencial en la fusión de membranas al interrumpir y conectar las bicapas lipídicas de la membrana de la célula del huésped (Gupta *et al.*, 2021). La región HR1 y HR2 es una estructura de seis hélices de aminoácidos esenciales para la fusión viral (Huang *et al.*, 2020). El dominio transmembrana (TM) ancla a la espiga dentro de la membrana viral y contribuyen a la estabilización de la estructura trimérica de la proteína S (Xia, 2021).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

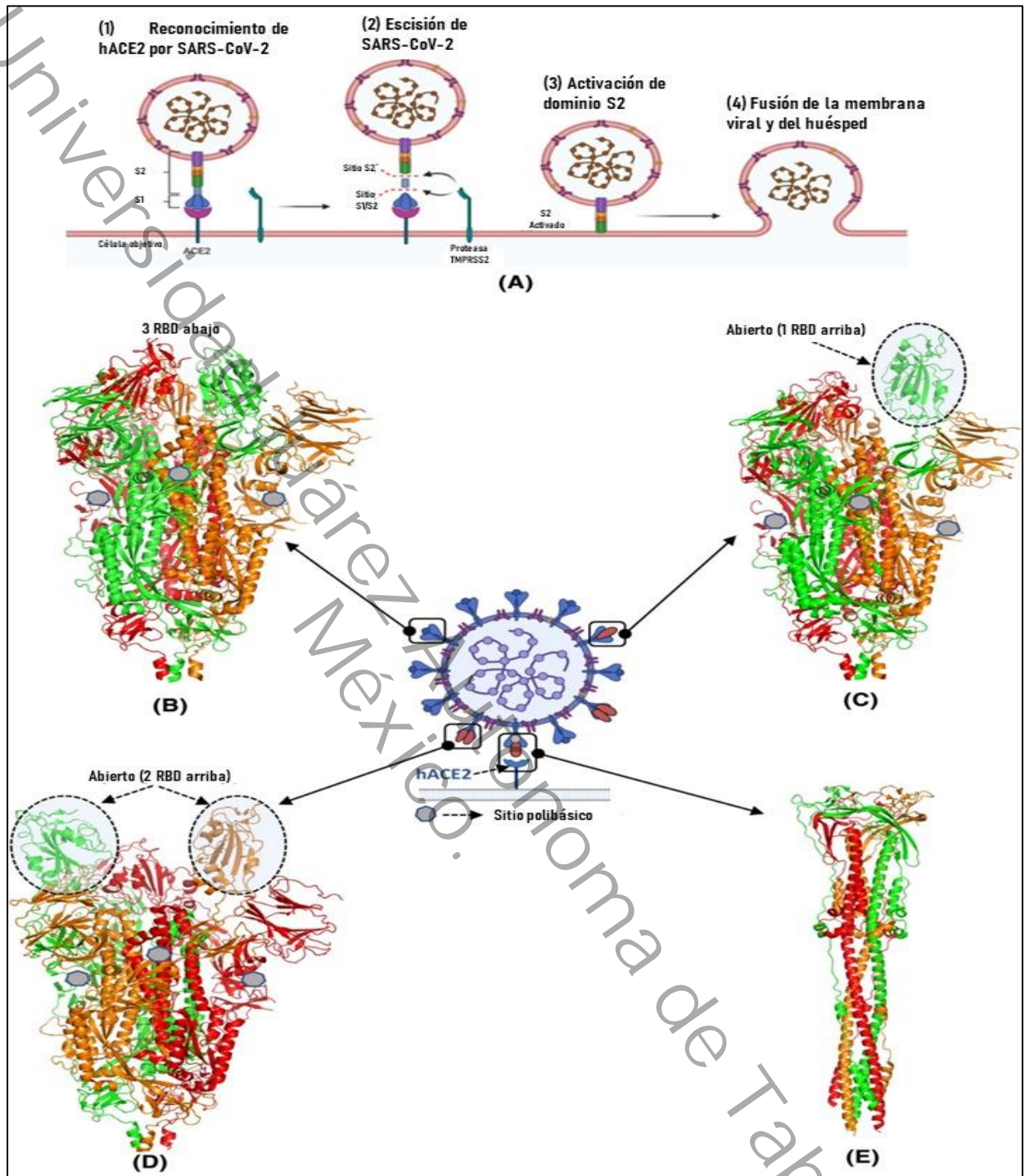


Figura 2. Proteína S y sus interacciones con el receptor ACE2

A) Representación esquemática del reconocimiento de la célula huésped y entrada de SARS-CoV-2. B) Estructura tridimensional de SARS-CoV-2 (cerrada, con los dominios de unión al receptor (RBD) abajo). C y D) Estructura tridimensional de SARS-CoV-2 abierta, 1 y 2 RBD hacia arriba, respectivamente. E) Estado de post-fusión de la proteína S (Tomado de Gupta *et al.*, 2021).



ENTRADA DEL CORONAVIRUS A LA CÉLULA HOSPEDERA

El virus SARS-CoV-2 utiliza un enmascaramiento conformacional que lo ocultan del sistema inmunitario, tiene un ciclo de replicación y traducción que inicia con la unión del virus-receptor de la célula huésped y termina con la liberación de la progenie recién generada de las células infectadas (Kirtipal *et al.*, 2020) (figura 3). La entrada del virus comienza cuando los trímeros de la superficie del virus se unen al receptor ACE2 a través de la unión de RBD de la subunidad S1 (Shang *et al.*, 2020).

La subunidad S1 al unirse al receptor ACE2, desencadena la fusión de la membrana viral y la membrana del huésped (Huang *et al.*, 2020). La base de la fusión de las membranas es la escisión de las subunidades S1 y S2 por la furina y por la TMPRSS2. Los sitios de escisión de furina de SARS-CoV-2 son múltiples, lo que mejora la infectividad (Li, 2016; Nyberg *et al.*, 2021). Después de la escisión de la proteína S, el péptido de fusión de la subunidad S2 del virus de SARS-CoV-2 queda expuesto y desencadena la fusión de las membranas del virus y las células huésped (Davies *et al.*, 2021).

En la célula huésped, el ARN viral se libera en el citoplasma y utiliza ARN de transferencia del huésped para la traducción de sus proteínas. Los productos de la traducción son las poliproteínas pp1a y pp1ab, que se escinden en proteínas no estructurales y forman el complejo replicasa transcriptasa (RTC) (Kadam *et al.*, 2021), el cual está compuesto por nsp7-8, nsp10, nsp14 (exoribonucleasa), nsp15 (endonucleasa), nsp16 (metiltransferasas) y la RNA polimerasa dependiente de RNA (Dubey *et al.*, 2021).

La proteína N se une al RNA viral, mientras que la proteína M es responsable del ensamblaje de las partículas virales, inhibe a NF- κ B y regula a la baja la respuesta antiviral del huésped. La proteína E está implicada en la patogénesis viral, el ensamblaje, la gemación y la formación de la envoltura de nuevos viriones (Guo *et al.*, 2020).

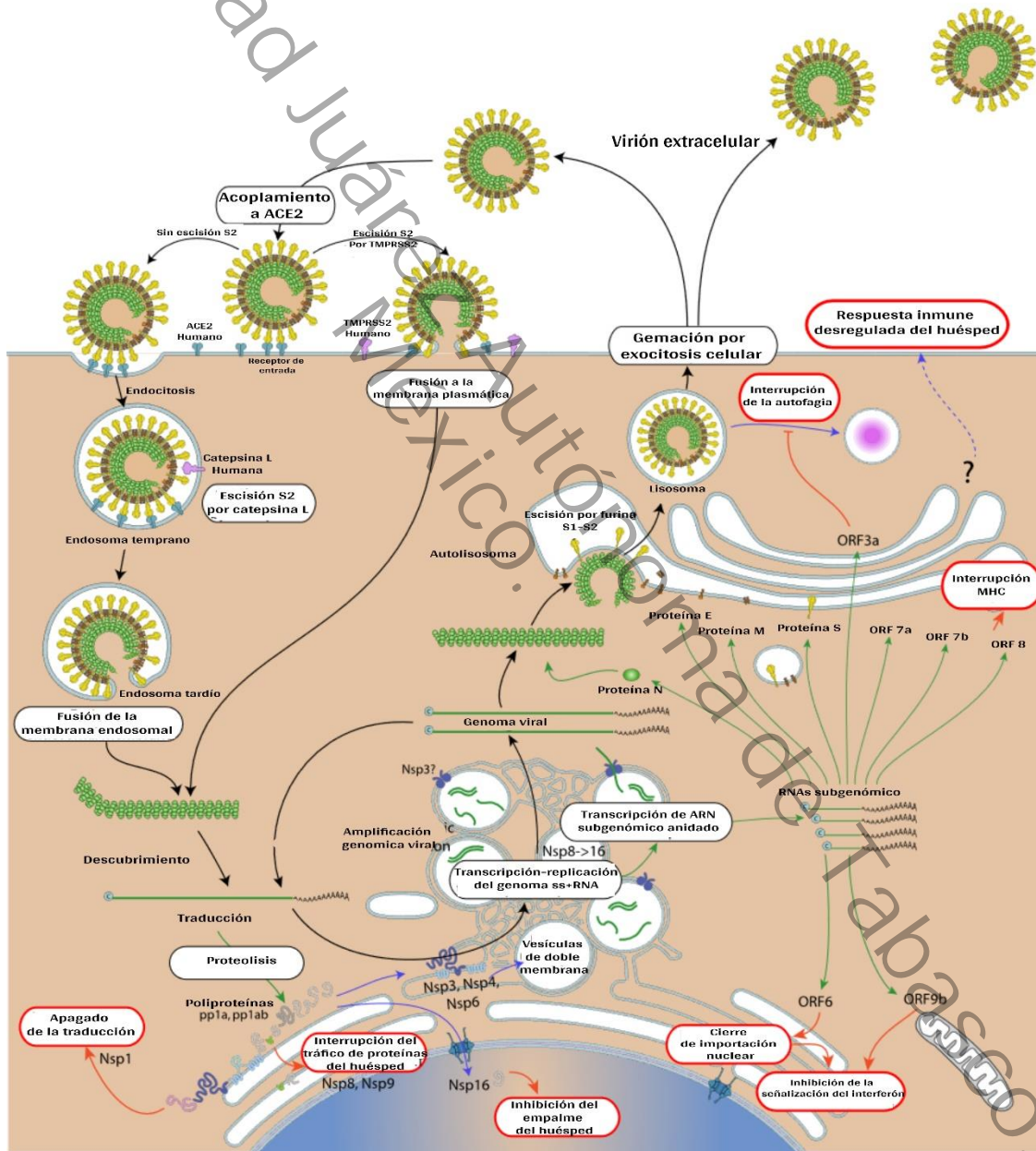




Figura 3. Ciclo de vida de SARS-CoV-2

El virus ingresa a la célula del huésped uniéndose al receptor ACE2 a través de la proteína S. En el citoplasma de la célula del huésped el ARN viral se libera y se traduce. El ARN genómico de sentido negativo se usa como molde para formar un ARN de sentido positivo. Las proteínas estructurales excepto la proteína N se traducen en el retículo endoplasmático y se transportan al aparato de Golgi para formar y liberar un virión maduro Tomado de <https://viralzone.expasy.org/9096>.

VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

Las técnicas moleculares se han utilizado con éxito para el diagnóstico de patógenos durante muchos años. Las pruebas diagnósticas de SARS-CoV-2 se basan en la detección de los ácidos nucleicos de forma cualitativa y cuantitativa. En este sentido, la prueba cualitativa advierte la detección del virus o no, mientras que la prueba cuantitativa genera una curva estándar usando concentraciones conocidas de RNA viral para estimar la cantidad de virus (McAdam, 2022).

Entre estas técnicas, la secuenciación es una herramienta importante en la epidemiología de las enfermedades infecciosas. En patógenos como el virus SARS-CoV-2, la secuenciación genómica juega un rol clave para la identificación de las rutas de transmisión e identificación de las fuentes y reservorios animales, (van Dorp *et al.*, 2020). Particularmente, se describieron los patrones de dispersión del virus, brindando la posibilidad de inferir la dinámica de transmisión y orientar sobre el diseño de medicamentos y vacunas (González-Candelas *et al.*, 2021).

Las tecnologías de secuenciación implementadas por las agencias de salud pública mundiales permitieron la identificación específica y la caracterización de los componentes genéticos del SARS-CoV-2 circulante, además de su correlación con las



características epidemiológicas (D'Agostino *et al.*, 2022). Entre las tecnologías de secuenciación destacan el método de Sanger que es una forma rápida y confiable de vigilancia epidemiológica (Shaibu *et al.*, 2021) y la secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés *Next-Generation Sequencing*) que permite la generación rápida de millones de pares de bases de ADN de forma masiva y paralela, a costos relativamente bajos (Matthijs *et al.*, 2016).

La NGS juega un papel importante en la búsqueda del origen y huéspedes intermediarios, al mismo tiempo, estudia el patrón evolutivo y la tasa de mutaciones del virus (Chen *et al.*, 2021). Entre otros beneficios el uso de tecnología NGS permitió la identificación rápida de nuevas variantes, la reconstrucción de las rutas de diseminación y brindó la base molecular para el diseño de vacunas y descubrimiento de fármacos (Lourenco *et al.*, 2020).

VARIANTES DE SARS-CoV-2

Los cambios de nucleótidos que emergen del genoma del virus SARS-CoV-2 durante el proceso de replicación son el resultado evolutivo de las presiones selectivas del hospedador y del medio (Aleem *et al.*, 2021; Mistry *et al.*, 2021). El mecanismo molecular por el que se formaron las variantes de SARS-CoV-2 es la recombinación homóloga. Generalmente este mecanismo se describe por la combinación de dos variantes del virus, el cual puede ocurrir durante la replicación viral. Por lo tanto, es fundamental definir que para que ocurra, debe haber una coinfección de la misma célula dentro de un individuo por virus genéticamente distintos, implícitamente describe



que requiere que haya circulación simultánea de múltiples linajes virales dentro de una población (Jackson *et al.*, 2021).

Los sistemas de clasificación de SARS-CoV-2 aceptados son múltiples. Los más utilizados son GISAID (por sus siglas en inglés Global Initiative on Sharing All Influenza Data), Nextstrain y Pango. El sistema GISAID identifica grandes clados caracterizados por mutaciones importantes con respecto a un genoma de referencia. El sistema de nomenclatura Pango es dinámico y se basa en las relaciones evolutivas, además, de la relevancia epidemiológica del linaje (Dubey *et al.*, 2021; González-Candelas *et al.*, 2021). El sistema Nextstrain utiliza el análisis filogenético y filodinámico para identificar clados y subclados estables evolutivos; en este sistema los clados se nombran con el año de aparición como prefijo, seguido de una letra que indica el orden en que se identificó el clado, aunque también, la Organización Mundial de la Salud (OMS) simplifica la comunicación pública de las mutaciones y las designa con letras del alfabeto griego; se clasifican en dos tipos: las variantes de interés (VOI), y las variantes de preocupación (VOC) según la situación de cada país (CDC, 2021; Choi & Smith, 2021).

Una variante de interés (VOI) se describe por los cambios genéticos que afectan las características del virus, transmisibilidad, gravedad de la enfermedad, escape inmunológico, diagnóstico o terapéutico, se reconocen como causantes de transmisión comunitaria significativa en diversos países con prevalencia relativa creciente y representan riesgos emergentes en salud pública (Choi & Smith, 2021). Una variante de preocupación (VOC) se refiere a las variantes virales con mutaciones en el dominio



de unión al receptor de la proteína S que mejoran drásticamente la afinidad de unión en el complejo RBD-ACE2 que causa una rápida diseminación en la población (Dudas *et al.*, 2021). En este contexto podemos asumir que una VOC cumple con la definición de una VOI, pero se asocia con cambios de importancia para la salud pública: aumenta la transmisibilidad o cambio perjudicial en epidemiología de COVID-19, aumento de la virulencia o cambio de presentación clínica de la enfermedad, y disminución de eficacia de las medidas sociales y de salud pública, diagnóstico, vacunas y terapéutica disponible (Choi & Smith, 2021).

MUTACIONES EN SARS-CoV-2

La transmisión del virus de SARS-CoV-2 de una población a otra produjo cambios genéticos debido a errores de copia de la ARN polimerasa, que condujo a mutaciones (Hofman *et al.*, 2021). Las mutaciones del SARS-CoV-2 mejoran las ventajas evolutivas del virus (Li, 2016), y con mayor frecuencia se encuentran en las secuencias que codifican la proteína S, RdRp y N (Franco-Muñoz *et al.*, 2020). La tasa mutación global de SARS-CoV-2 es de 2.5 mutaciones/mes, sin embargo, por las altas tasas de transmisión la tasa de mutación es más alta (Ngoi *et al.*, 2021).

En general, las mutaciones en la proteína S surgen como un subproducto natural de la replicación viral que afecta la transmisibilidad, con tendencia a fortalecer la afinidad de unión de ACE2-RBD, además, del escape de la protección de anticuerpos y la propensión a la reinfección (Franco-Muñoz *et al.*, 2020; Lauring & Hodcroft, 2021; Suárez *et al.*, 2020; Zella *et al.*, 2021).

Los mecanismos por los que las mutaciones de la *proteína S* pueden potenciar la infección y/o escape inmune están relacionados con la estructura general y su función (Figura 4).

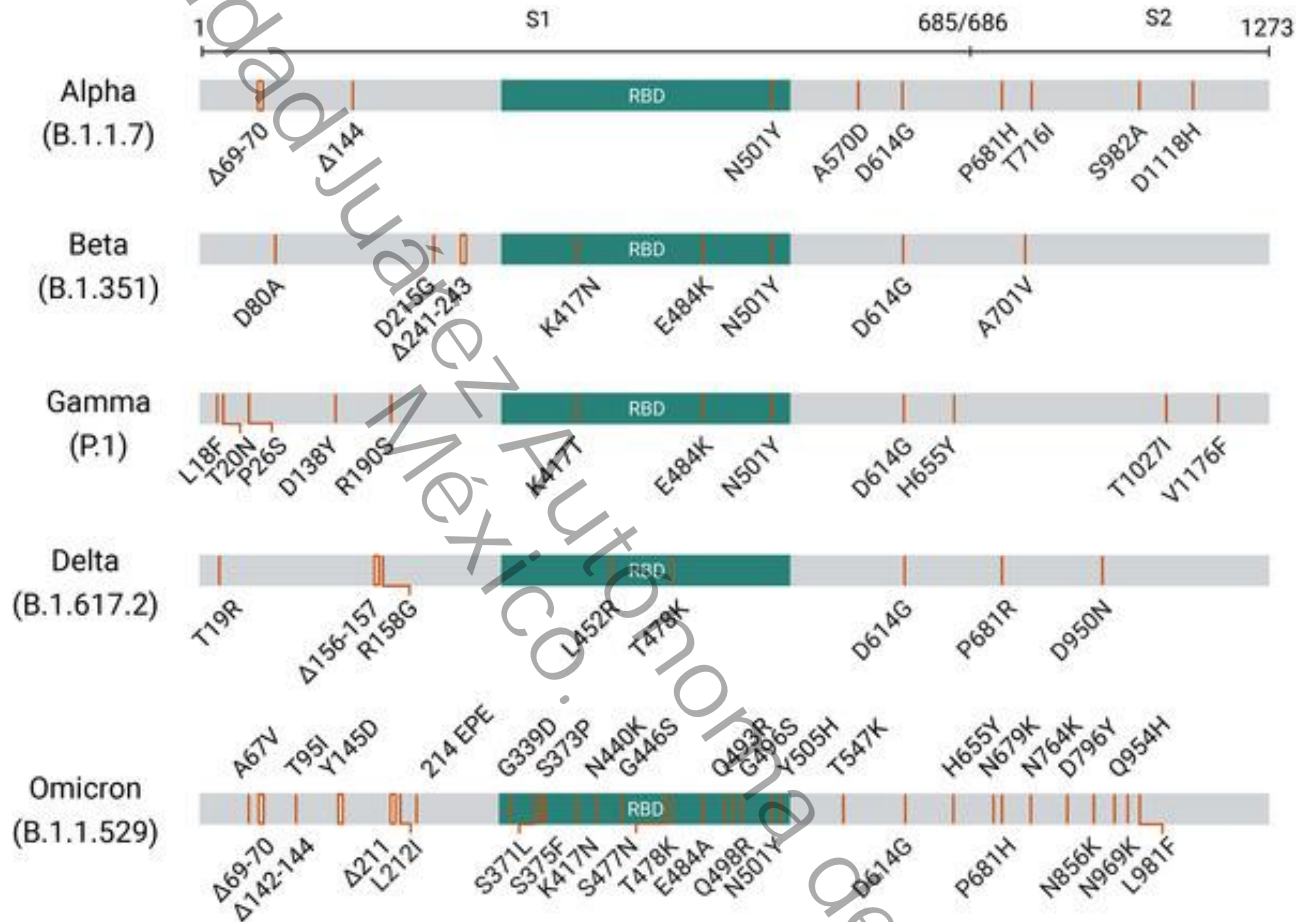


Figura 4. Mutaciones de SARS-CoV-2

La imagen muestra la localización de las mutaciones presentes en la proteína S de 5 variantes de SARS-CoV-2 (WHO, 2021).

D614G es la mutación donde un ácido aspártico se sustituye por glicina en la posición 614 (Korber *et al.*, 2020). Es reconocida como la primera mutación detectada,



que en un periodo corto de tiempo se ubicó como la forma dominante de SARS-CoV-2 (Lauring & Hodcroft, 2021) y se relacionó con una carga viral más alta (Dubey *et al.*, 2021).

A medida que avanzaba la pandemia surgió la mutación N501Y, que es clave en el dominio de unión al receptor (RDB). La mutación N501Y fortalece los enlaces de hidrógeno intermoleculares entre el complejo RBD-ACE2 y, por lo tanto, da como resultado una mayor infectividad y afinidad (Gupta *et al.*, 2021). La mutación K417N de lisina a asparagina en la posición 417 se ubica en uno de los sitios determinantes de RBD que se asocia con una unión reducida con el receptor ACE2. La mutación N439K es una de las mutaciones RBD más comunes que ocurren de forma independiente en todo el mundo (Gupta *et al.*, 2021). La mutación S477N ocurre en la región del bucle flexible (473–490) de la proteína S que es responsable de una unión fuerte con ACE2 (Gupta *et al.*, 2021).

Otras mutaciones importantes son N440K, L452R, T478K y E484K. N440k se relaciona con una mayor transmisión e infecciosidad, así como con un escape inmunitario debido a que provoca una inversión de carga que contribuye a distintas perturbaciones conformacionales en la región del bucle RBM frente al receptor ACE2. También se describió que la mutación L452R favorece la adaptabilidad física del SARS-CoV-2. Esta mutación se relaciona con una mayor afinidad, evasión inmunitaria, mayor infectividad y transmisión (Gupta *et al.*, 2021). La mutación T478K reside en la interfaz RBD-ACE2 e incrementa la unión con ACE2 y afecta el potencial de neutralización por anticuerpos monoclonales (Gupta *et al.*, 2021). La mutación E484K



es responsable de la transmisión rápida, incrementa la infectividad de las variantes, e interfiere con la capacidad de los anticuerpos para unirse a la región RBD y la mutación S494P contribuye al aumento de la afinidad (Gupta *et al.*, 2021).

ANTECEDENTES

Los estudios experimentales demuestran la utilidad clínica de la aplicación de tecnologías de secuenciación para prevenir y combatir amenazas en salud pública (Sahajpal *et al.*, 2021). A finales del año 2019 en China, los primeros análisis genómicos de muestras clínicas de pacientes con enfermedad respiratoria revelaron una nueva cepa de virus de la familia *Coronaviridae* (Wu *et al.*, 2020). El establecimiento de la secuencia de referencia de SARS-CoV-2 resultó trascendental para la investigación de la patogenia, el curso de la enfermedad, el diagnóstico, la prevención y tratamiento de la infección (Wang *et al.*, 2020).

La pandemia se propagó por tres años debido a que los cambios en la traducción de proteínas condujeron a inestabilidad funcional, como consecuencia, la acumulación de mutaciones, alteraciones estructurales y la aparición de nuevas variantes potencialmente más contagiosas (Bui *et al.*, 2021).

Las mutaciones en la proteína S desarrollaron particular interés por su participación en la interacción con células del huésped y la evasión inmune. En este sentido, estudios de vigilancia genómica global revelaron la presencia de mutaciones en el total de muestras analizadas en Ghana, y su cercanía con la cepa de Wuhan (Ngoi *et al.*, 2021). También, contribuyó en la detección de variantes de SARS-CoV-2



(Daniels *et al.*, 2021; Dorlass *et al.*, 2021), y las implicaciones de las mutaciones de la proteína S sobre la inmunidad del huésped, el rendimiento de las pruebas de diagnóstico y la efectividad de las vacunas (Gálvez *et al.*, 2022).

Otros estudios se centraron en la caracterización de variaciones mutacionales en muestras no respiratorias. En este contexto se identificó la secuencia del genoma de SARS-CoV-2 en muestras de heces (Papoutsis *et al.*, 2021), saliva (Hofman *et al.*, 2021), líquido cefalorraquídeo (Wang *et al.*, 2021), además de muestras ambientales (D'Agostino *et al.*, 2022).

Análisis recientes demuestran que la identificación de las mutaciones en la proteína S son necesarias para entender cómo se relacionan con la transmisión y la infección (Dubey *et al.*, 2021; Zhang & Jackson, 2020).



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los virus que surgen periódicamente son una amenaza potencial para la humanidad. El SARS-CoV-2 es el responsable de la enfermedad del coronavirus 19 (COVID-19, por sus siglas en inglés, *Coronavirus Disease 2019*) que se extendió por todo el mundo. En el año 2019, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Wuhan inició con la descripción epidemiológica de los primeros casos de neumonía de etiología desconocida (Hasöksüz *et al.*, 2020). Durante las primeras semanas epidemiológicas del año 2020 se confirmaron cerca de 10,000 casos distribuidos en 20 países (WHO, 2020). En los primeros 4 meses del año 2020 se estimó un total de 3,090,445 casos en todo el mundo.

En México, el primer caso fue detectado el 27 de febrero de 2020 y a partir de esta fecha la cantidad de infecciones causadas por COVID-19 fueron casos importados del extranjero y sin contagios locales, sin embargo, los casos incrementaron rápidamente y para el 30 de abril de 2020 se confirmaron 19,224 casos (Suárez *et al.*, 2020).

La diseminación mundial del SARS-CoV-2 contribuyó con los cambios adaptativos del genoma. Estos cambios, alteran su potencial patógeno, además dificultan el desarrollo de fármacos y vacunas. En una revisión reciente, Pachetti y colaboradores caracterizaron 8 mutaciones de SARS-COV-2 y resaltan la importancia de la vigilancia genómica (Pachetti *et al.*, 2020). A través de la vigilancia genómica se encontraron cambios estructurales del virus; como consecuencia se reportaron 11 variantes a partir de mediados del año 2020, lo que representa un reto para la



identificación y contención de la propagación de variantes de virus con ventajas selectivas (Mohammadi *et al.*, 2021).

Las conclusiones con respecto a la gravedad de la enfermedad de las variantes no son consistentes en la información científica disponible. Es por lo que conocer la diversidad del SARS-CoV-2, y el efecto en la gravedad de la enfermedad en la población tabasqueña es necesario, además de conocer el impacto potencial en la eficacia del diagnóstico, vacunas y terapéutica. Derivado del contexto anterior surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son las características de la proteína S del del virus SARS-CoV-2 y las implicaciones clínicas en pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” con la gravedad de la enfermedad durante la pandemia 2020-2022?



JUSTIFICACIÓN

La reciente pandemia de SARS-CoV-2 logró que sobresaliera el papel de la vigilancia epidemiológica y la biología molecular. La evolución molecular del SARS-CoV-2 y la aparición de cepas con la proteína S mutada tuvo consecuencias en la evasión inmune, la infectividad y transmisibilidad que resultaron directamente proporcionales a la propagación y gravedad de la enfermedad en la población de tabasqueña, lo que demuestra la magnitud de este estudio.

Debido a la alta tasa de mutación del virus SARS-CoV-2 y de su amplia distribución geográfica, la determinación del genotipo tiene impacto sobre la elección del tratamiento y en el panorama epidemiológico. En este contexto, la identificación de cambios en la estructura de la proteína S del SARS-CoV-2 y el conocimiento de los virus circulantes en pacientes de un hospital público en Tabasco resulta útil para mejorar la toma de decisiones en materia de salud pública, que se traduce como mejoras en el diagnóstico, tratamiento y prevención lo que demuestra la conveniencia social de este trabajo.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar las características de la proteína S del virus SARS-CoV-2 y las implicaciones clínicas en pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” con la gravedad de la enfermedad durante la pandemia 2020-2022.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las características clínicas de los pacientes con COVID-19 de los pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” durante la pandemia 2020-2022.
2. Secuenciar el gen S del virus SARS-CoV-2 de los pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” durante la pandemia 2020-2022.
3. Asociar el tipo de variantes genéticas con las complicaciones clínicas del COVID-19 en los pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” durante la pandemia 2020-2022.



MATERIAL Y MÉTODOS

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este trabajo se realizó en cumplimiento a los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, descritos en la Ley General de Salud en materia de investigación en México (DOF, 1987); fue registrado con el número ACTRN12620001265965 ante la Australian New Zealand Clinical Trials y con el número CEIJGC-2023-04 por el Comité de Ética del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”.

SUJETOS

Se analizó una muestra no probabilística de 200 pacientes mayores de 18 años, con resultado positivo a SARS-CoV-2 procedentes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”. La información clínica fue obtenida de los expedientes. Se construyó un entorno para captura en el software Excel®, que fue dividida en 3 secciones. La primera sección se destinó para las variables de identificación y sociodemográficas donde se incluyó número de expediente, sexo, edad, ocupación y lugar de residencia. La segunda sección se destinó a las características clínicas al inicio de la enfermedad y progresión durante la hospitalización, se consideraron las variables: fecha de ingreso y egreso hospitalario, días de estancia intrahospitalaria, síntomas, comorbilidades y fármacos, parámetros de laboratorio y signos vitales. En la última sección se capturó la información resultante de la detección de SARS-CoV-2 y datos genómicos provenientes de la secuenciación.



Los parámetros de laboratorio que se extrajeron del expediente clínico fueron: biometría hemática completa, proteína c reactiva (PCR), química sanguínea, electrolitos séricos, prueba de funcionamiento hepático, tiempos de coagulación, fibrinógeno, dímero D, interleucina 6, ferritina, procalcitonina.

La biometría hemática completa se obtuvo bajo la tecnología de citometría de flujo fluorescente a través del analizador hematológico sysmex XT-4000i™. Las muestras para PCR, química sanguínea, PFH, electrolitos séricos y ferritina se procesaron en analizador COBAS INTEGRA 400 plus, que utiliza las tecnologías siguientes: fotometría de absorción, turbidimetría, fluoroimmunoanálisis y análisis potenciométrico. El valor de procalcitonina e IL-6 se obtuvo por el método de quimioluminiscencia en el analizador de inmunología automatizada LIAISON®. Los tiempos de coagulación se obtuvieron por método manual.

FLUJO DE TRABAJO

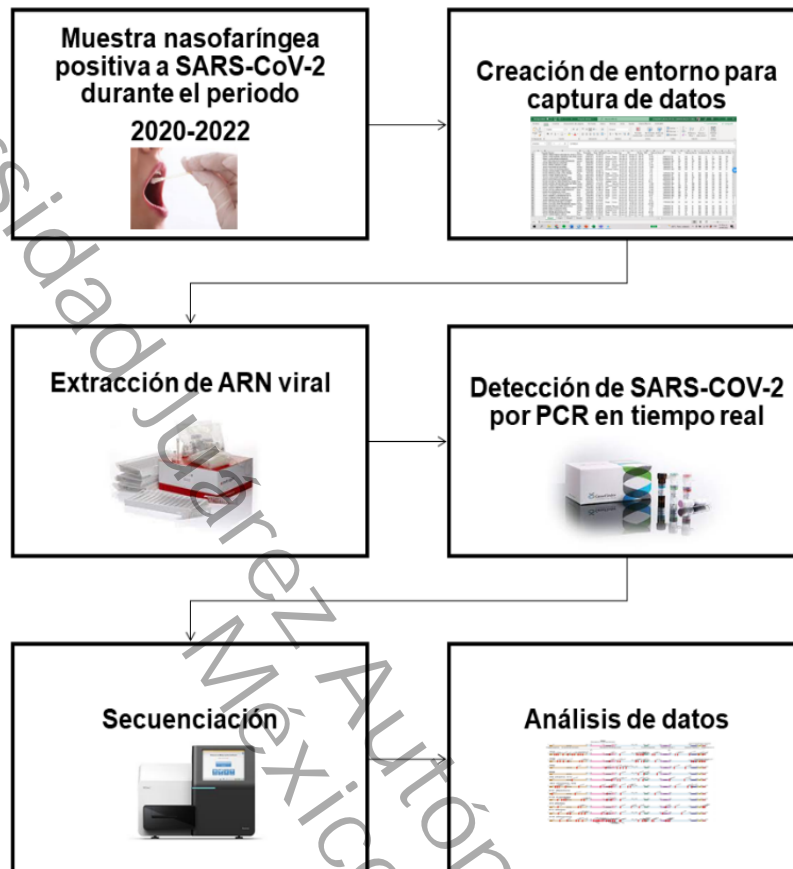


Figura 5. Diseño experimental

La imagen muestra la dirección del flujo de trabajo, iniciando con la identificación de muestras nasofaríngeas positivas a SARS-CoV-2, creación de entorno para captura de datos sociodemográficos y clínicos de la muestra seleccionada, extracción del material genético, detección de SARS-CoV-2 y sus características.

EXUDADO NASO/FARÍNCEO

De acuerdo con el algoritmo para ingreso hospitalario, a la llegada al área de urgencias del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” se realizaba una toma de exudado nasofaríngeo.

En el área de toma de muestra, al paciente se le informó la técnica de muestreo. En resumen, el paciente se encontraba sentado, se le elevó la cabeza ligeramente y por una de las fosas nasales se introdujo suavemente un hisopo flexible, después de avanzar 5 o 6 cm y encontrar resistencia se rotó unos segundos para asegurar la obtención de material biológico adecuado (Figura 6). Posteriormente, se introdujo un hisopo por la boca, con apoyo de un abatelenguas se limitó el movimiento de la lengua para poder frotar con firmeza la orofaringe. Los dos hisopos se colocaron en un tubo con medio de transporte viral previamente identificado. Las muestras fueron procesadas y se conservó el medio viral a - 80°C.

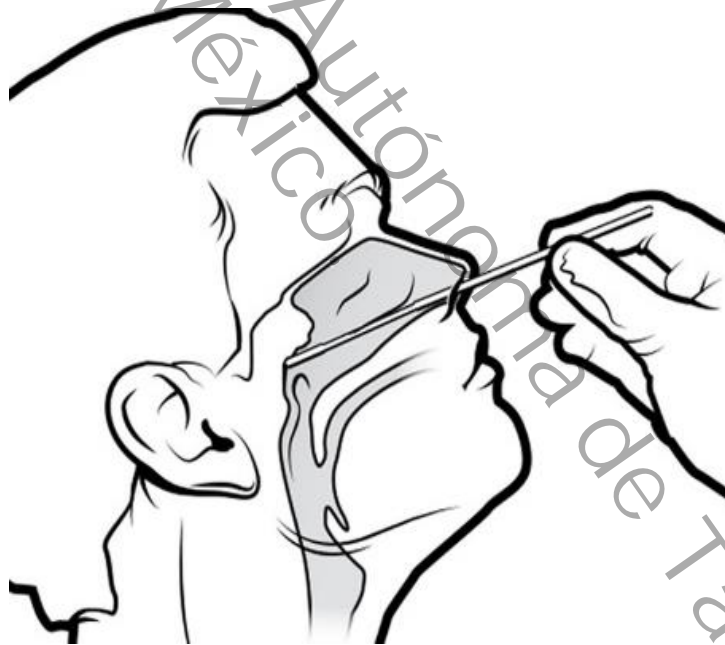


Figura 6. Técnica para la obtención de muestra nasofaríngea

Dibujo de la técnica de obtención de material biológico para el diagnóstico de SARS-CoV-2.



EXTRACCIÓN DEL RNA VIRAL

Una vez seleccionadas las muestras de exudado naso/orofaríngeo con resultado positivo con valor de CT menor de 25, se identificaron y descongelaron para hacer una extracción de RNA viral mediante el equipo automatizado iPrep™ PureLink® Virus Kit (INVITROGEN®).

DETECCIÓN DE SARS-COV-2

La detección de SARS-CoV-2 se realizó en el equipo de PCR en tiempo real QuantStudio5™ Real-Time PCR (Applied Biosystems), y la amplificación con GeneFinder™ COVID19 Real Amp Kit v2 (Cat IFMR-45) (OSANG Healthcare Co., Lt.).

GeneFinder™ es una prueba multiplex que tiene como objetivo identificar 3 genes virus en una sola reacción que están sintetizados con diferentes marcadores fluorescentes. Para la detección se ajustaron los canales de fluorescencia tal y como se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Canales de fluorescencia para la detección de SARS-CoV-2.

Gen	Fluorescencia
RdRP	FAM
E	Texas Red
N	VIC
Control interno	Cy5

La reacción se realizó de acuerdo con las características descritas por el fabricante. Se preparó una solución *máster mix* compuesta por la combinación de 10 µl de COVID-19 reaction Mixture, 5 µl Probe Mixture y 5 µl de muestras de ARN aisladas y purificadas. Bajo las siguientes condiciones: transcripción reversa durante

20 minutos a 50°C, desnaturalización inicial de 5 min a 95°C y 45 ciclos de desnaturalización durante 15 segundos a 95°C y alineamiento 60 segundos a 58°C.

Para la interpretación de las pruebas se ajustaron los siguientes valores: threshold para los genes virales *E* y *RDRP* en 15,000 y para el gen *N* y control interno en 5,000. La línea basal se estableció entre los ciclos 3 y 15 para los 4 genes. El valor de corte para considerar una prueba positiva es un $Ct \leq 40$ para *N*, *E* y *RDRP*, y ≤ 35 para el control interno (Figura 7).

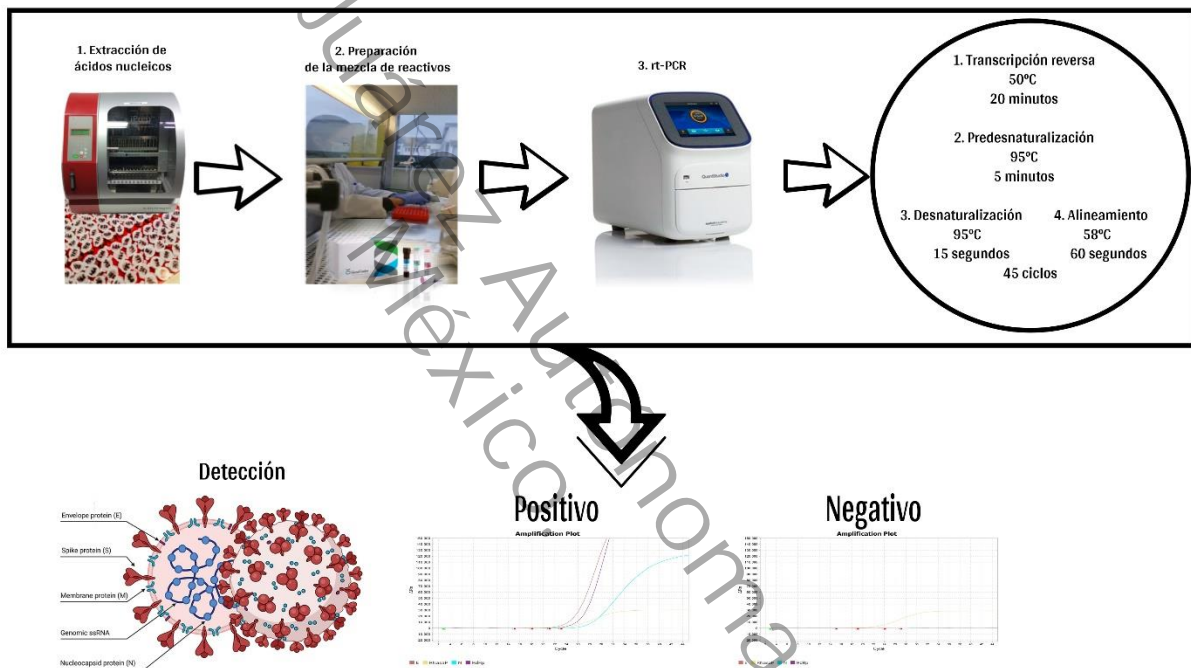


Figura 7. Descripción general del diagnóstico de COVID-19 por RT-PCR

Representación gráfica del flujo de trabajo unidireccional para la detección de SARS-CoV-2 en muestras nasofaríngeas. Las muestras se llevaron al área de extracción de ARN, los extractos de ácidos nucleicos previamente identificados se trasladaron al área de preparación de reactivos. En la placa con mezcla de reactivos se añadió el extracto. La placa con la reacción de PCR se llevó al termociclador para la detección. Fuente: Este estudio.



SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)

El genoma de los virus aislados fue obtenido a través de secuencia de nueva generación. Las muestras con ARN positivo con valores de CT \leq 25 se sometieron a secuenciación del genoma completo en el Laboratorio de Diagnóstico Genómico del Instituto Nacional de Medicina Genómica en la Ciudad de México.

Las bibliotecas se prepararon siguiendo las instrucciones del protocolo Illumina COVIDSeq test, después de extraer el ARN de las muestras se alineó para preparar la síntesis y posterior amplificación de ADNc, el siguiente paso incluyó la fragmentación, etiquetado, limpieza y amplificación de los amplicones, para finalmente realizar la agrupación y dilución de las bibliotecas.

La secuenciación se realizó en la plataforma NextSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA). Una vez completada la secuenciación, el análisis se llevó a cabo en el sistema Illumina DRAGEN COVIDSeq. (Figura 8).

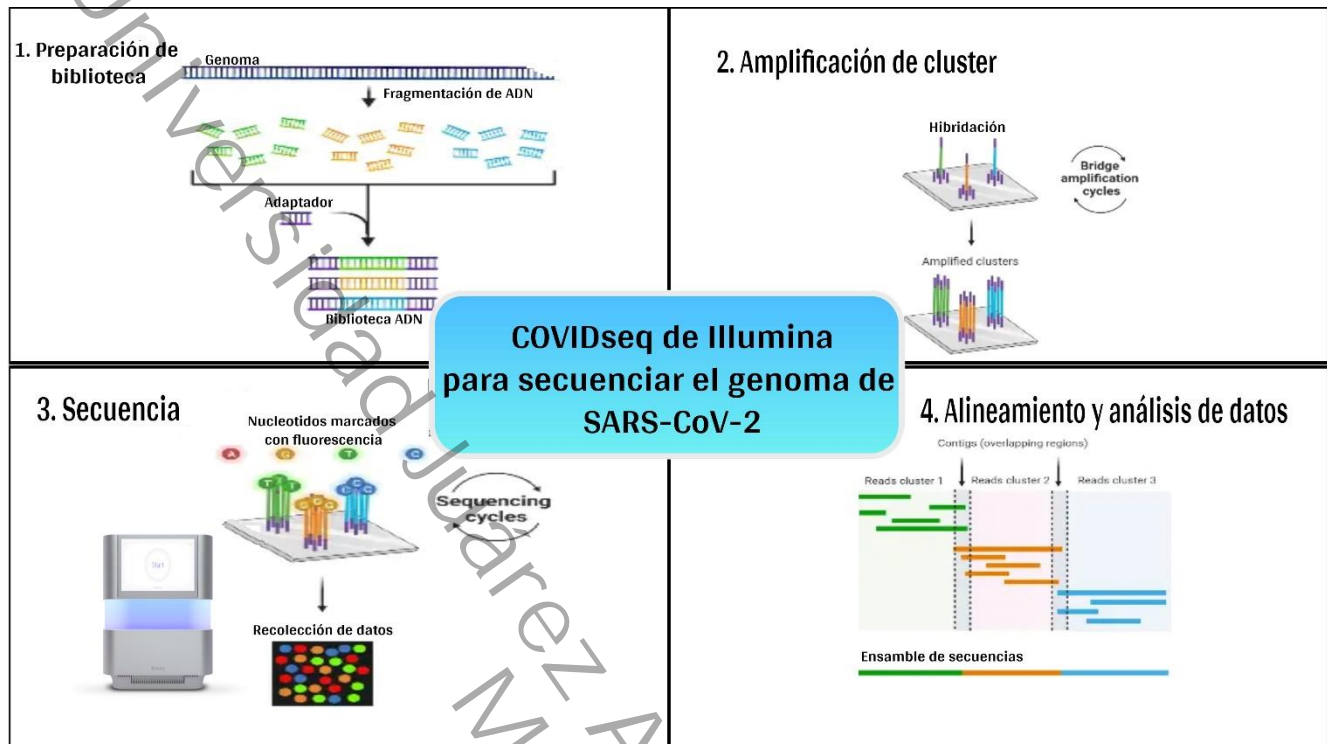


Figura 8. Determinación de la secuencia genómica de SARS-CoV-2 por NGS

Representación de los 4 procesos básicos de Illumina para secuencia de SARS-CoV-2. 1. Preparación de bibliotecas, 2. Generación de clúster y amplificación en forma de puente. 3. Secuenciación y 4. Análisis de datos. Fuente: Este estudio.

ANÁLISIS DE DATOS

Se recolectaron datos sociodemográficos y clínicos, y se sistematizaron en un entorno para captura del programa SPSS v21. Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva. Las variables cuantitativas se resumieron a través de media, mediana, moda, las variables cualitativas se sintetizaron por medio de frecuencia y porcentaje.



Las variables categóricas se compararon mediante la prueba de chi cuadrado, y la prueba de Fisher según el caso, las variables continuas mediante análisis de varianza de 1 vía (ANOVA), considerando estadísticamente significativo resultados $p < 0.05$.

Se descargó la secuencia de la variante ancestral de SARS-CoV-2 del National Center for Biotechnology information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de los National Institutes of Health (NIH) de los Estados Unidos. El archivo FASTA que contenía la secuencia de la proteína S de las 197 muestras se cargó en el sitio web Clustal Omega, junto con la variante ancestral, se analizaron los resultados para obtener la alineación de secuencias múltiple, y se identificó el número de mutaciones de la secuencia de la proteína S.

Se descargó la estructura tridimensional de la proteína S del RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB, <https://www.rcsb.org/>), y se construyó la figura tridimensional de cada clado señalando los cambios de aminoácidos a través del software UCSF ChimeraX (University of California at San Francisco Chimera; <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).



RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON COVID-19

Con respecto a las características sociodemográficas, la media de edad de los pacientes incluidos fue de 61.7 ± 17.0 años, con un mínimo de 18 y máximo de 96 años, con predominio de los grupos de edad 66-70 y 71-75 como se muestra en la figura 9. El 58.9% (n = 116) fueron hombres.

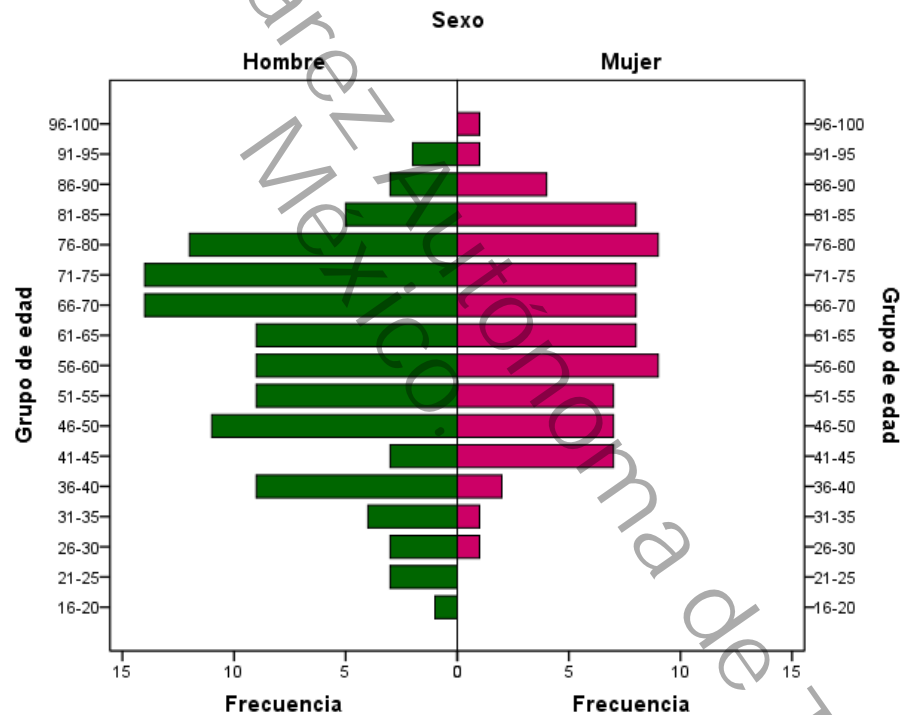


Figura 9. Distribución por grupo de edad y sexo

El eje de las X representa la frecuencia y en el eje de las Y se muestran los grupos de edad. Las barras de color verde representan a los hombres y las barras de color púrpura a las mujeres. Fuente: Este estudio.

Con respecto al lugar de residencia, el 49.2% (n = 97) de los casos incluidos son procedentes del municipio de Centro, y el resto provenía de alguno de los municipios restantes del estado (figura 10).

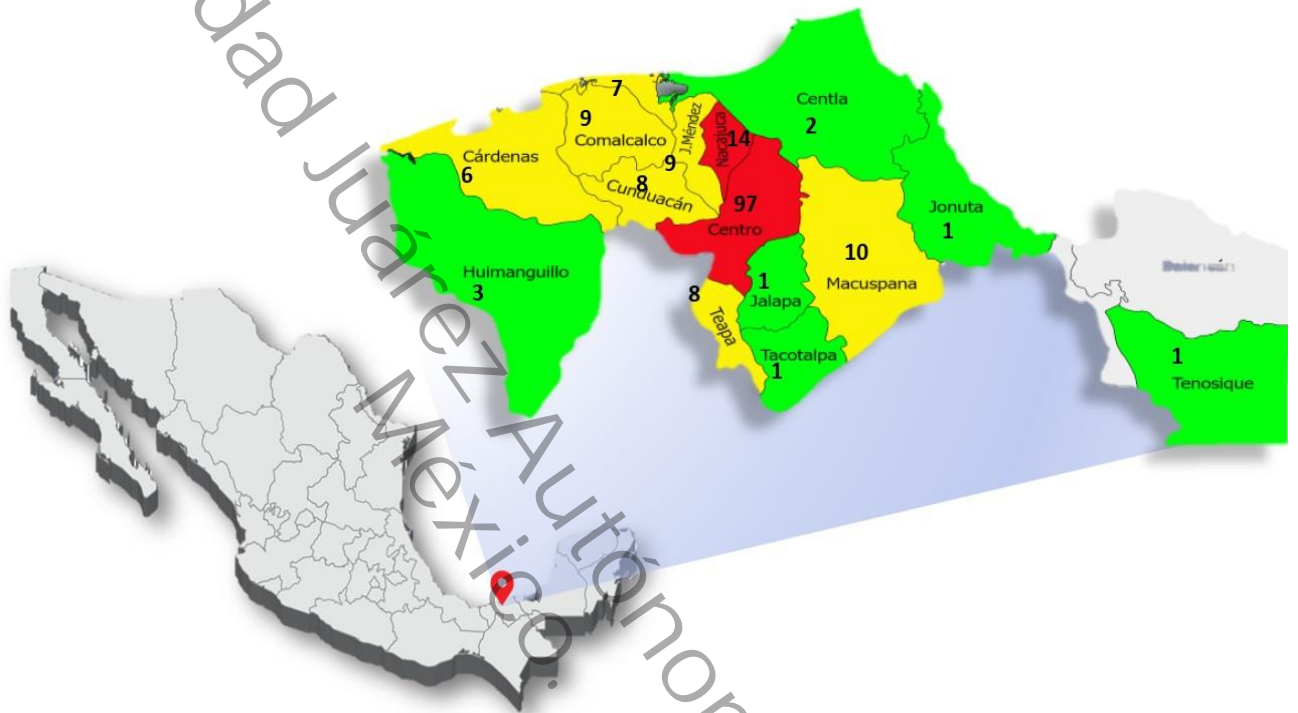


Figura 10. Distribución geográfica de casos de SARS-CoV-2

El mapa de Tabasco muestra la ocurrencia de casos de SARS-CoV-2 en los municipios que lo integran. Los colores se relacionan con la frecuencia de los casos registrados, en verde los municipios que tuvieron 1-5 casos, en amarillo de 6 a 10 y de rojo mayor a 11 casos. Se describe en cada municipio el nombre y el número de casos, los municipios Balancán y Emiliano Zapata no están identificados debido a que no hubo ninguna infección incluida con esa procedencia. Fuente: Este estudio.



Las características clínicas de los pacientes muestran que se encontró una media de 6.4 ± 3.0 síntomas. Como se observa en la figura 11, los síntomas con mayor frecuencia en el grupo fueron 65% (n = 128) fiebre, 77.2% (n = 152) tos, 68.5% (n = 135) cefalea y 68% (n = 134) disnea.

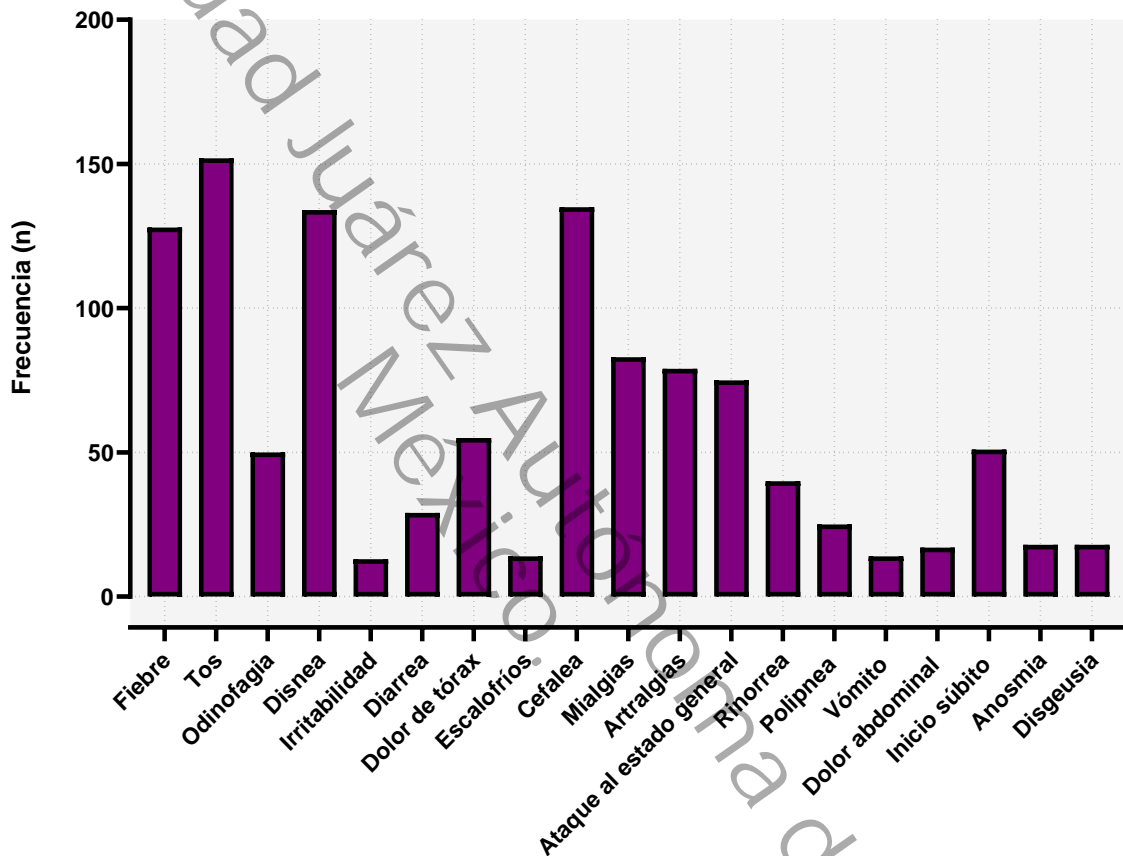


Figura 11. Manifestaciones clínicas de los pacientes con COVID-19 del Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús"

Gráfico de barras de las manifestaciones clínicas de los pacientes con COVID-19 al ingreso del Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús". Cada barra muestra la frecuencia de los síntomas. Fuente: Este estudio.



Las enfermedades coexistentes tuvieron una media de 1.3 ± 1.0 , con un máximo de 5 comorbilidades. Es interesante destacar que, las comorbilidades predominantes fueron 32.5% ($n = 64$) diabetes, 39.6% ($n = 78$) hipertensión arterial, y 21.8% ($n = 43$) obesidad. Sólo el 1% reportó antecedente de tabaquismo como se observa en la figura 12.

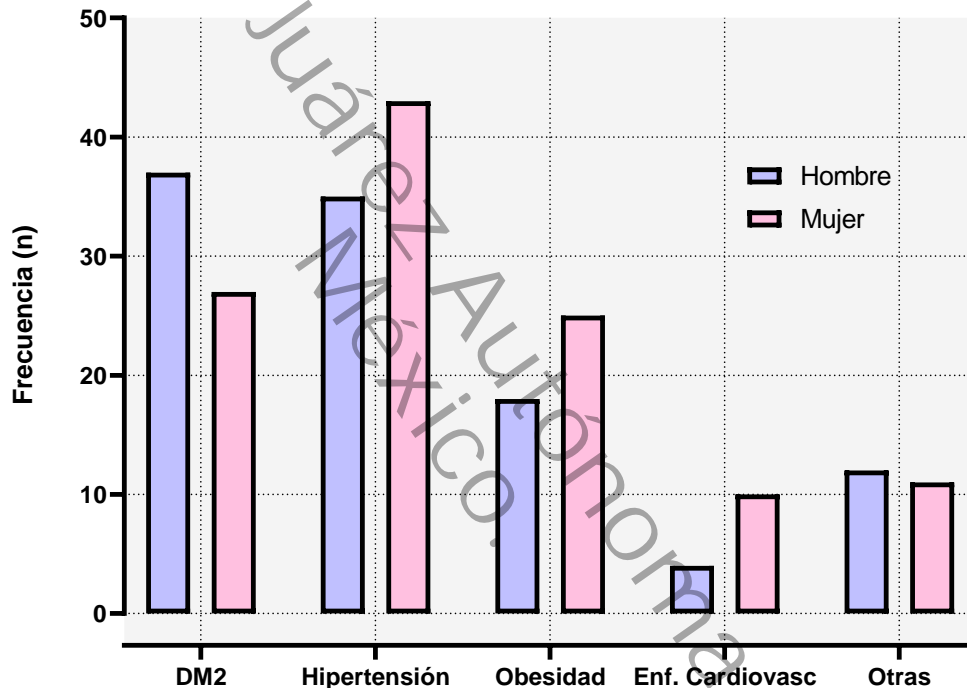


Figura 12. Enfermedades coexistentes de los pacientes con COVID-19 del Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús"

Gráfico de barras de las enfermedades coexistentes de los pacientes con COVID-19 al ingreso del Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús". Las barras color azul representan la frecuencia de la comorbilidad en hombres y la barra color rosado en mujeres. Fuente: Este estudio.



La media de la concentración sérica de los parámetros de laboratorio obtenidos al ingreso de los pacientes se resume en la tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones séricas evaluadas al ingreso de los pacientes con COVID-19

Parámetro (unidad)	Media \pm EE	Mín	Máx
Eritrocitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4.2 \pm 0.06	1.0	6.31
Hemoglobina (g/dL)	12.4 \pm 0.1	3.5	17.3
Hematocrito (%)	37.7 \pm 0.5	9.8	56.2
Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	12.3 \pm 0.5	0.5	87.2
Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	1.7 \pm 0.4	0	81.1
Monocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0.6 \pm 0.0	0	11.5
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	0.02 \pm 0.0	0	0.9
Basófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	0.01 \pm 0.0	0	0.3
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	10.6 \pm 0.6	0.05	94.5
Trombocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	245.4 \pm 12.4	4.0	1989.0
Proteína C Reactiva	189.0 \pm 9.3	5.0	542.8
Glucosa (mg/dL)	178.2 \pm 7.3	11.0	617.0
Urea (mg/dL)	60.8 \pm 3.7	8.6	327.4
BUN (mg/dL)	28.3 \pm 1.7	1.2	153.0
Creatinina (mg/dL)	2.0 \pm 0.4	0.07	68.5
Na (mmol/L)	137.3 \pm 0.5	111.0	199.0
K (mmol/L)	4.5 \pm 0.05	3.1	8.0
CL (mmol/L)	100.3 \pm 0.5	35.3	117.0
Bilirrubina total (mg/dL)	0.7 \pm 0.0	0.1	13.4
Bilirrubina Directa (mg/dL)	0.3 \pm 0.0	0	10.1
Bilirrubina Indirecta (mg/dL)	0.4 \pm 0.0	0	3.3
Proteínas totales (g/dL)	7.0 \pm 0.3	4.0	73.4
Albumina (g/dL)	3.5 \pm 0.4	2.1	5.0
Globulina (g/dL)	3.1 \pm 0.0	0.2	5.5
ALT (UI/L)	50.7 \pm 5.1	8.0	770.0
AST (UI/L)	73.5 \pm 11.1	18.0	1778.0
FA (UI/L)	127.1 \pm 6.9	39.0	857.0
DHL (UI/L)	478.3 \pm 26.5	157.0	4113.0
Fibrinógeno (mg/dL)	563.9 \pm 17.8	80.8	949.7
Dímero D (mg/L)	4.6 \pm 1.0	0.19	80.0
Tiempo de protrombina (seg)	13.2 \pm 0.3	4.7	56.1
INR	1.1 \pm 0.0	0.7	5.06
Tiempo de tromboplastina parcial activado (seg)	34.2 \pm 1.2	18.6	180.0
Ferritina (ng/mL)	738.2 \pm 74.3	54.5	8590.0
Procalcitonina ($\mu\text{g/L}$)	1.4 \pm 0.4	0.01	54.68
IL-6 (pg/mL)	145.7 \pm 19.4	1.0	1000



Abreviaturas: BUN: Nitrógeno Ureico en Sangre; Na: Sodio; K Potasio; Cl: Cloro; ALT: alanino aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; FA: fosfatasa alcalina; DHL: Lactato deshidrogenasa, INR: Índice Internacional Normalizado. Fuente: Este estudio.

El 56.1% (n = 110) del total de los pacientes egreso por defunción y con respecto a la media de días de estancia intrahospitalaria fue de 5.6 ± 3.6 días. En la figura 13 se observa que no hay diferencia estadística los DEIH de los pacientes que egresó por mejoría y los que murieron (12.7 ± 1.1 vs 9.9 ± 1.0 , t 1.7238, p 0.086).

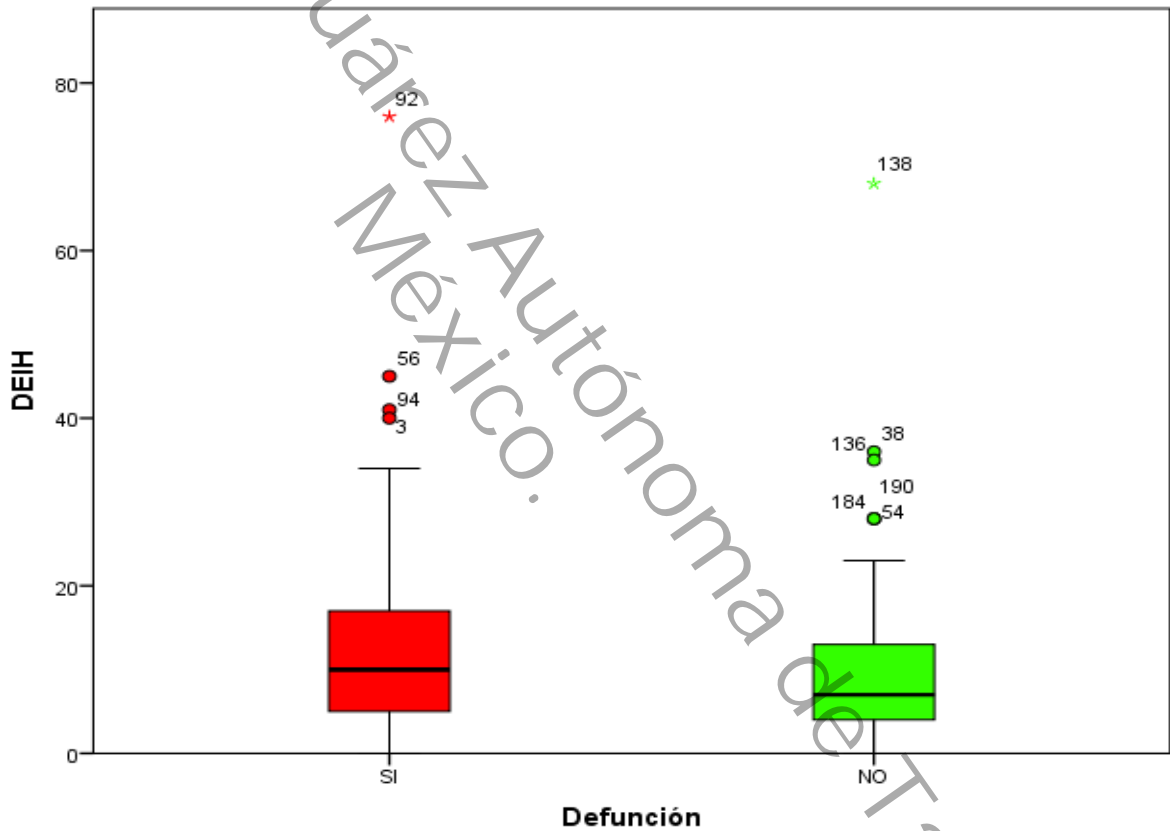


Figura 13. Días de estancia intrahospitalaria (DEIH) por motivo de egreso

Gráfico de caja con bigotes de la media de días de estancia intrahospitalaria (DEIH) distribuido por tipo de egreso. Cada figura muestra la media, el mínimo y el máximo de edad; en color rojo los DEIH de los pacientes que murieron y en color verde de los que mejoraron. Fuente: Este estudio.



ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DEL GEN S DEL VIRUS SARS-CoV-2 PROVENIENTES DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON COVID-19.

De los 200 pacientes seleccionados con resultado positivo para SARS-CoV-2 en una muestra nasofaríngea tomada entre junio de 2020-febrero de 2022, el 98.5% (n = 197) fueron seleccionadas para secuenciación. Una vez verificada la calidad de las secuencias, se procedió a su análisis. Todas las secuencias analizadas de pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”, se clasificaron a través de clados. El 26.9% (n = 53) pertenece al clado 21K (Ómicron), el 27.4% (n = 54) al 20B, el 19.8% (n = 39) al 20A, tal y como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Clados circulantes de SARS-CoV-2 en pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”

	Frecuencia	Porcentaje
20A	39	19.8
20B	54	27.4
20C	13	6.6
20G	4	2.0
20I (Alpha, V1)	1	.5
20J (Gamma, V3)	7	3.6
21C (Épsilon)	1	.5
21G (Lambda)	7	3.6
21I (Delta)	7	3.6
21J (Delta)	11	5.6
21K (Ómicron)	53	26.9
Total	197	100.0

Fuente: Este estudio.



Primero se analizó el número de sustituciones de aminoácidos de la proteína S por paciente, donde se observó que la frecuencia más alta fue de una sustitución y un máximo 32 mutaciones (figura 14).

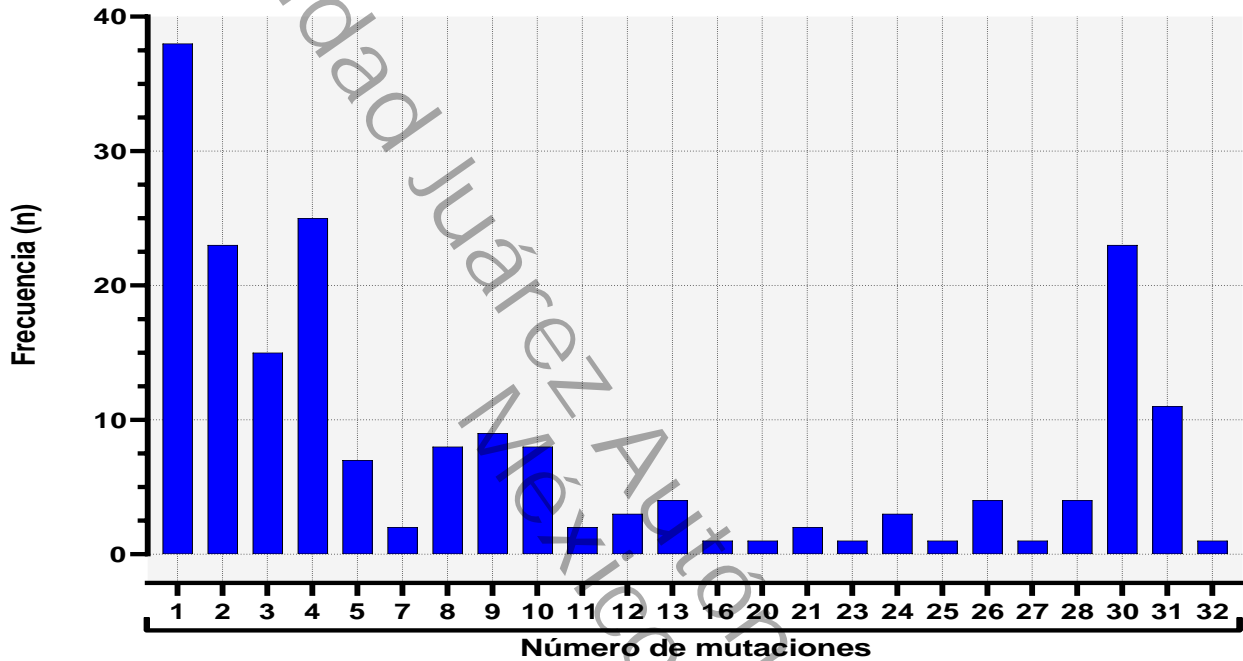


Figura 14. Frecuencia de mutaciones de la proteína S

Las barras muestran la frecuencia del número de sustituciones de la proteína S detectados por paciente. Fuente: Este estudio.



Después, el número de sustituciones de la proteína S se analizó por clados. En la tabla 6 se muestra que la media fue 10.7 ± 11.2 sustituciones, con un mínimo de 1 y máximo de 32, obteniendo un total de 121 mutaciones. Destaca que la media más alta fue el clado 21K (Ómicron), seguido del 20J (Gamma, V3).

Tabla 6. Media de mutaciones de la proteína S por clado

Clado	N	Media \pm DE	Mínimo	Máximo
20A	39	2.0 ± 2.1	1.0	10.0
20B	54	3.2 ± 1.2	1.0	5.0
20C	13	1.7 ± 0.7	1.0	3.0
20G	4	2.5 ± 0.5	2.0	3.0
20I (Alpha, V1)	1	7.0	7.0	7.0
20J (Gamma, V3)	7	12.5 ± 0.5	12.0	13.0
21C (Épsilon)	1	4.0	4.0	4.0
21G (Lambda)	7	8.1 ± 0.8	7.0	10.0
21I (Delta)	7	10.0 ± 0.5	9.0	11.0
21J (Delta)	11	9.0 ± 0.8	8.0	11.0
21K (Ómicron)	53	28.3 ± 3.4	16.0	32.0
Total	197	10.7 ± 11.2	1.0	32.0

DE: Desviación estándar. Fuente: Este estudio.

También analizamos la distribución de las mutaciones con respecto a la estructura de la proteína S de SARS-CoV-2 en la tabla 7. Aquí se observa que la mayor proporción de mutaciones se encuentran en la subunidad 1.



Tabla 7. Distribución de mutaciones por región del genoma de la proteína S.

Región	Estructura	Posición y cambio de aa				
Subunidad S1 (Residuos 14-685)	Péptido señal (Residuos 1-13)	S13I				
	Dominio N-terminal (Residuos 14-305)	C15F	R21I	V70F	T114S	T208M
		L18F	P26S	G75V	D138Y	L212I
		L18R	T29I	G75R	Y145D	A222V
		T19R	W64R	T76I	H146Q	D228H
		T20N	A67V	T95I	W152C	H245Y
		T20S	I68T	K97E	M153T	D253N
				R102I	R158G	G257S
	Residuos 306-318	V308L			R158S	W258R
	Dominio de Unión al Receptor (RBD) (Residuos 319-541)	G339D	S375F	D427V	S477N	Q493R
		R346K	P384L	N440K	T478	G496S
		S371L	K417N	G446S	E484A	Q498R
		S373P	K417T	L452R	E484K	N501Y
	Residuos 542-685			L452Q	F490S	Y505H
		T547K	T604I	V642G	Q675H	
A570D		D614G	G446V	T676A	N679K	
T573I		V622I	E654Q	T676I	P681H	
L585F		S640F	H655Y	Q677G	P681R	
Residuos 686-787	A688V	A701V	T732A	S735A	N764K	
	P681H			T716I	G769V	
Péptido fusión (FP) (Residuos 788-806)	D796Y					
Residuos 807-911	P812L	N856K	T859I	T859N	A879S	
	A831V			A871V		
Subunidad S2 (Residuos 686-1273)	Secuencia Heptada Repetida 1 (HR1) (Residuos 912-984)	L922F D950N	Q954H N969K	L981F	S982A	
	Residuos 985-1162	T1027I F1052Y N1074S	A1078S V1104L	D1118H	G1124V D1139H	D1153Y P1162S
Secuencia Heptada Repetida 2 (HR2) (Residuos 1163-1213)	V1176F	V1189I	L1200V	E1207D		
Dominio Terminal (Residuos 1213-1237)	C1235F					
Dominio Citoplasmático (Residuos 1237-1273)	M1237I	D1260Y	V1264L			

aa: aminoácido. Fuente: Este estudio

Las mutaciones identificadas en la secuencia de la proteína S de los clados circulantes se encuentran representados por magnitud en la figura 15 y su descripción en la Tabla 8. La mutación más común fue D614G identificada en todas las muestras.

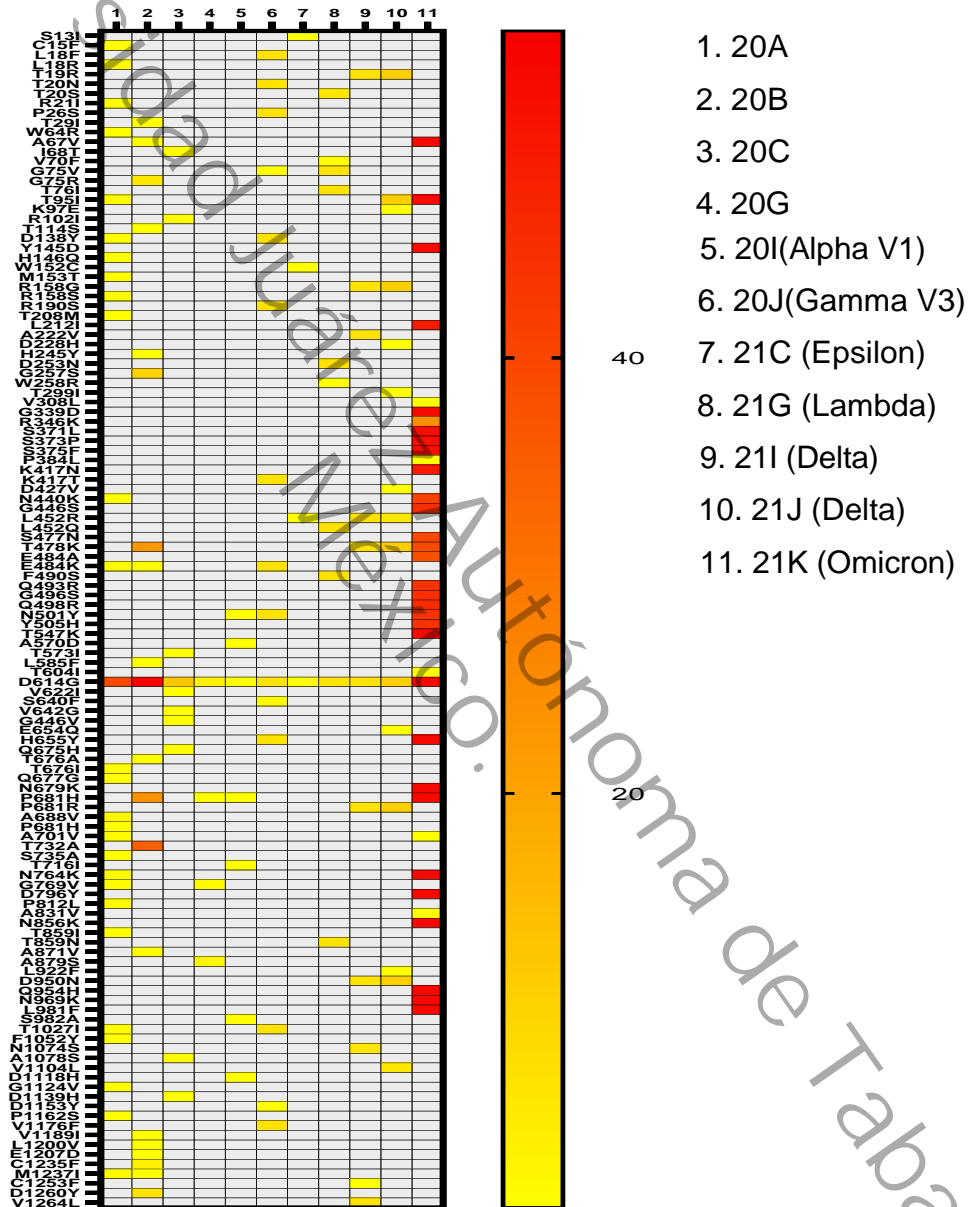


Figura 15. Mutaciones en la secuencia de la proteína S distribuida por clados

En el mapa de calor ilustra las mutaciones que afectan a la proteína S del total de las 197 secuencias que integran los 11 clados circulantes. Las celdas blancas muestran los valores iguales a 0, mientras que la intensidad de los colores va del valor mínimo 1 (color amarillo) a 55 como máxima intensidad (color rojo). Coincide que todas tienen al menos una mutación en la proteína S. Fuente: Este estudio.



Tabla 8. Mutaciones en la secuencia de la proteína S distribuida por clados

Clado	Cambio y posición del aa afectado
20A	C15F, L18R, W64R, T95I, D138Y, H146Q, M153T, R158S, T208M, N440K, E484K, D614G, T676I, G769V, Q677G, P681H, A688V, A701V, S735A, N764K, G769V, P812L, T859I, T1027I, F1052Y G1124V, P1162S, M1237I
20B	T29I, A67V, G75R, T114S, H245Y, G257S, E484K, T478K, L585F, D614G, P681H, T676A, T732A, A871V, V1189I, L1200V, E1207D, C1235F, D1260Y, M1237I
20C	I68T, R102I, G446V, T573I, D614G, V622I, V642G, Q675H, A1078S, D1139H
20G	D614G, P681H, G769V, A879S
20I (Alpha, V1)	N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H
20J (Gamma, V3)	L18F, T20N, P26S, G75V, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, S640F, H655Y, T1027I, D1153Y, V1176F
21C (Épsilon)	S13I, W152C, L452R, D614G
21G (Lambda)	T20S, V70F, G75V, T76I, D253N, W258R, L452Q, F490S, D614G, T859N
21I (Delta)	T19R, R158G, A222V, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, N1074S, C1253F, V1264L
21J (Delta)	T19R, T95I, K97E, R158G, D228H, T299I, D427V, L452R, T478K, D614G, E654Q, P681R, L922F, D950N, V1104L
21K (Ómicron)	A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371F, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, T604I, D614G, H655Y N679K, P681H, A701V, N764K, D796Y, A831V, N856K, Q954H, N969K, L981F

aa: Aminoácido. Fuente: Este estudio.

La figura 16 muestra a estructura tridimensional provista por el Protein Data Bank (PDB): 7DF4. La posición de las mutaciones de la proteína S se mapearon en la estructura tridimensional por clados circulantes en la figura 16.

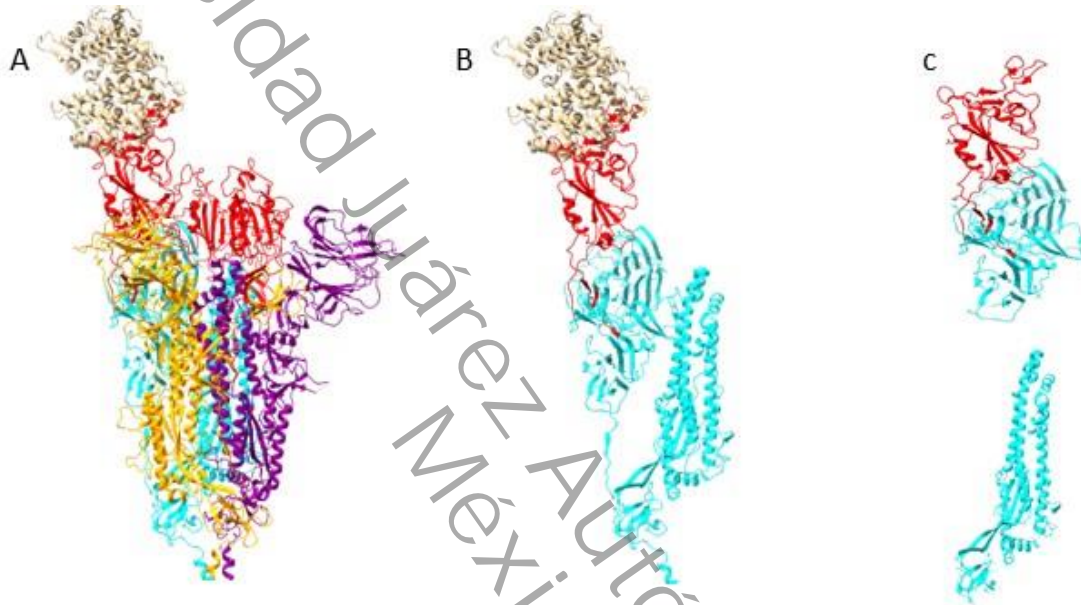


Figura 16. Estructura tridimensional de la proteína S

En el panel A se muestra la conformación trimérica de la proteína S tridimensional coloreada por regiones unida con el receptor ACE2 (estructura café) a través del RBD (estructura color rojo). El panel B se refiere a la estructura tridimensional de un monómero de la proteína S (color azul) El panel C, en la parte superior resalta la subunidad 1 (S1) (color azul) y RBD (color rojo), en la parte inferior la subunidad 2 (S2). Fuente: Este estudio.



En el clado 20A se encontró una media de mutaciones de 2.0 ± 2.1 . El 64.5% (n = 24) de las muestras que constituyeron este clado tuvieron una mutación única (D614G), el 5.1% (n = 2) presentó dos sustituciones (R21I, D614G), como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 20A

Mutación	Frecuencia	Porcentaje
D614G	24	61.5%
R21I, D614G	2	5.1%
C15F, D614G	1	2.6%
T208M, D614G	1	2.6%
D614G, T676I	1	2.6%
D614G, A701V	1	2.6%
D614G, G769V	1	2.6%
D614G, T859I	1	2.6%
D614G, G1124V	1	2.6%
D614G, P1162S	1	2.6%
D138Y, D614G, A701V	1	2.6%
H146Q, D614G, Q677G, G769V	1	2.6%
W64R, M153T, D614G, P681H, A688V, S735A, T1027I, F1052Y	1	2.6%
L18R, T95I, R158S, E484K, D614G, A688V, N764K, P812L, M1237I	1	2.6%
L18R, T95I, R158S, N440K, E484K, D614G, A688V, N764K, P812L, M1237I	1	2.6%
Total	39	100.0%

Fuente: Este estudio.

Los aminoácidos mutados identificados en muestras del clado 20A se encuentran distribuidos en los dominios funcionales de la proteína S, con mayor frecuencia en la región NTD y en la subunidad S2. En la figura 17 se muestran los sitios de sustitución de aminoácido en la estructura tridimensional de un monómero proteína S.

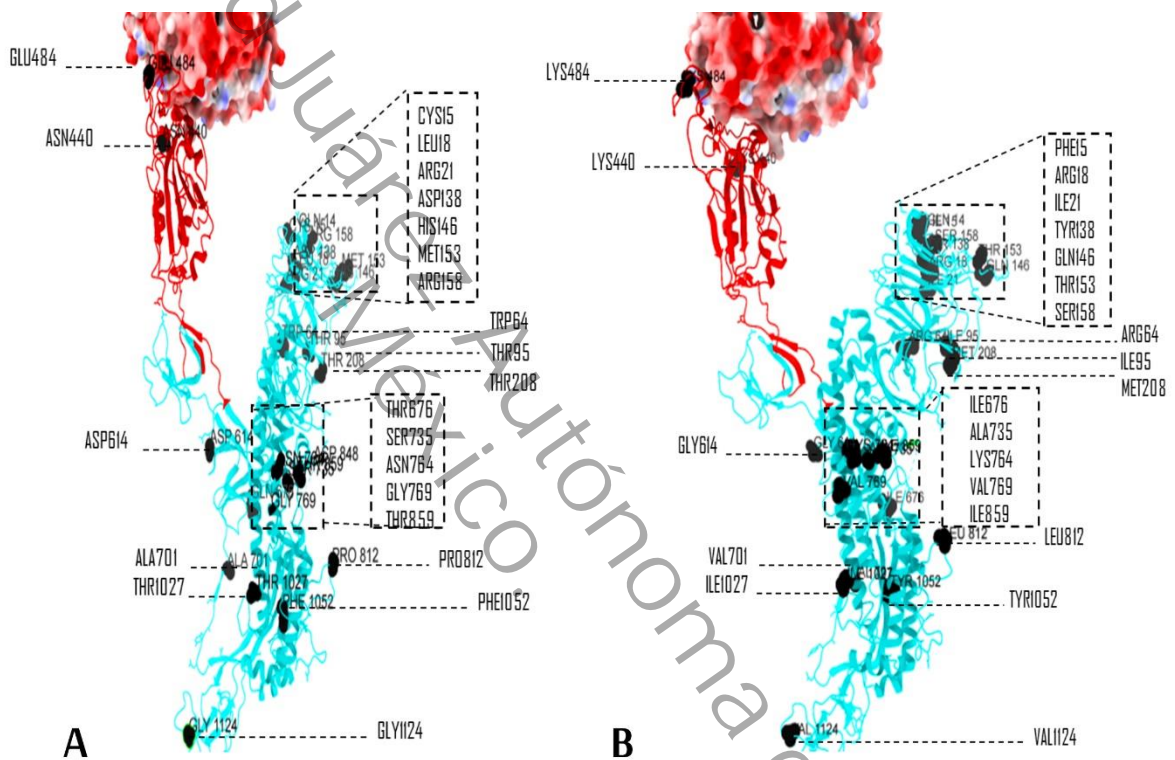


Figura 17. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 20A

En el panel A se muestra la conformación tridimensional de un monómero de la proteína S tridimensional (estructura original). Los sitios estructurales marcados de color negro representan el aminoácido que será sustituido. En el panel B, se muestra la estructura tridimensional del clado 20A, donde el sitio marcado de color negro ya está ocupado por otro aminoácido. Fuente: Este estudio.



En el clado 20B se encontró una media de mutaciones de 3.2 ± 1.2 . El 33.4% (n = 18) de las muestras que constituyeron este clado presentó 4 sustituciones (T478K, D614G, P681H, T732A), el 16.7% (n = 9) presentó una única sustitución (D614G), dos grupos distintos con frecuencias de 7.4% (n = 4) respectivamente, presentaron 3 y 4 sustituciones como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 20B

Mutación	Frecuencia	Porcentaje
T478K, D614G, P681H, T732A	18	33.3%
D614G	9	16.7%
D614G, T732A, C1235F	4	7.4%
G75R, G257S, D614G, D1260Y	4	7.4%
G257S, D614G, T732A	3	5.6%
D614G, T732A	2	3.7%
E484K, D614G	1	1.9%
L585F, D614G	1	1.9%
D614G, V1189I	1	1.9%
G257S, D614G, D1260Y	1	1.9%
D614G, T676A, T732A	1	1.9%
D614G, T732A, M1237I	1	1.9%
H245Y, D614G, P681H, T732A	1	1.9%
T29I, T478K, D614G, P681H, T732A	1	1.9%
T114S, T478K, D614G, P681H, T732A	1	1.9%
A67V, T478K, D614G, P681H, T732A	1	1.9%
G75R, G257S, E484K, D614G, D1260Y	1	1.9%
G75R, G257S, D614G, A871V, D1260Y	1	1.9%
T478K, D614G, P681H, T732A, L1200V	1	1.9%
T478K, D614G, P681H, T732A, E1207D	1	1.9%
Total	54	100.0%

Fuente: Este estudio.

Los aminoácidos mutados identificados en muestras del clado 20B se encuentran distribuidos en los dominios funcionales de la proteína S, con mayor frecuencia en la región NTD. En la figura 18 se muestran los sitios de sustitución de aminoácido en la estructura tridimensional de un monómero la proteína S.

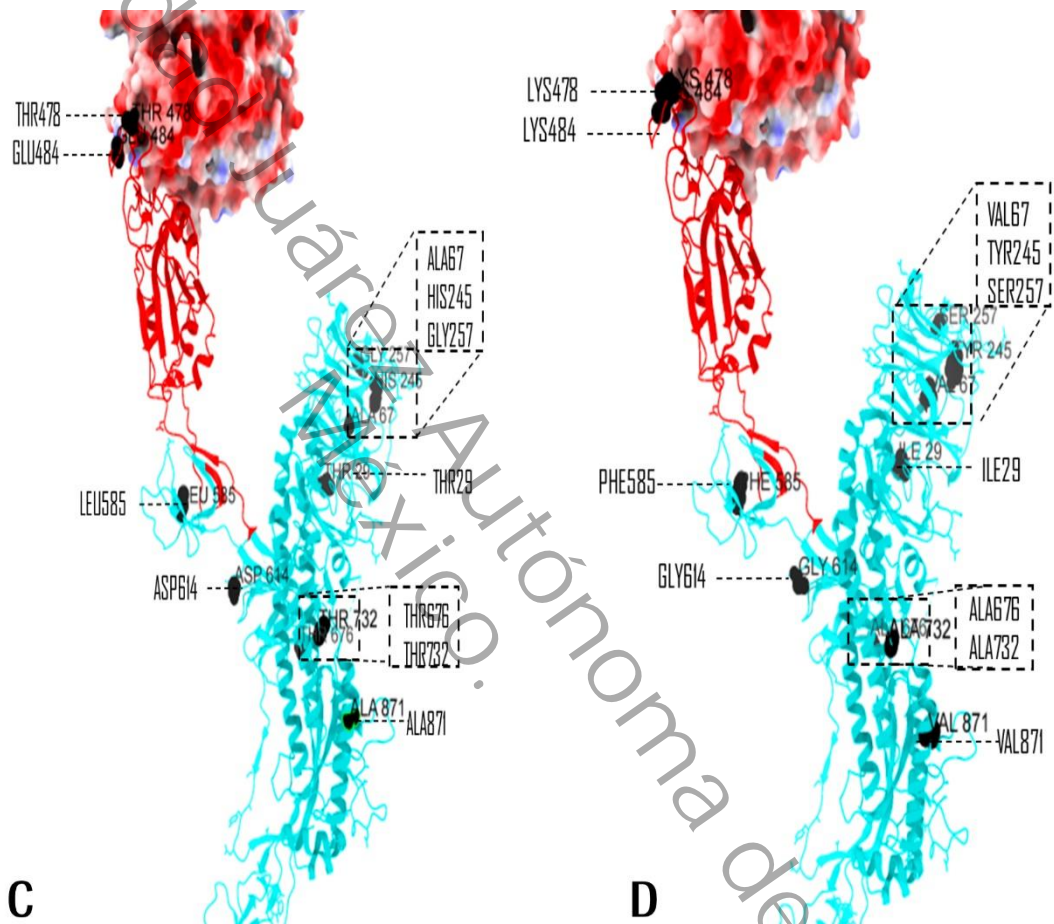


Figura 18. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 20B

En el panel C se muestra la conformación tridimensional de un monómero de la proteína S tridimensional (estructura original). Los sitios estructurales marcados de color negro representan el aminoácido que será sustituido. En el panel D, se muestra la estructura tridimensional del clado 20 B, donde el sitio marcado de color negro ya está ocupado por otro aminoácido. Fuente: Este estudio.



En el clado 20C se encontró una media de mutaciones de 1.7 ± 0.7 . El 38.5% ($n = 5$) de las muestras que constituyeron este clado presentó 1 sustitución (D614G), el 15.4% ($n = 2$) presentó dos sustituciones (D614G, A1078S), y con menor frecuencia 2 a tres sustituciones, como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 20C

Mutación	Frecuencia	Porcentaje
D614G	5	38.5%
D614G, A1078S	2	15.4%
D614G, V622I	1	7.7%
I68T, D614G	1	7.7%
G446V, D614G	1	7.7%
D614G, V642G	1	7.7%
R102I, D614G, D1139H	1	7.7%
T573I, D614G, Q675H	1	7.7%
Total	13	100.0%

Fuente: Este estudio.

Los cambios de aminoácidos en muestras del clado 20C se encuentran distribuidos en los dominios funcionales de la proteína S, principalmente en la región NTD. En la figura 19 se muestran los sitios de sustitución de aminoácido en la estructura tridimensional de un monómero de la proteína S.

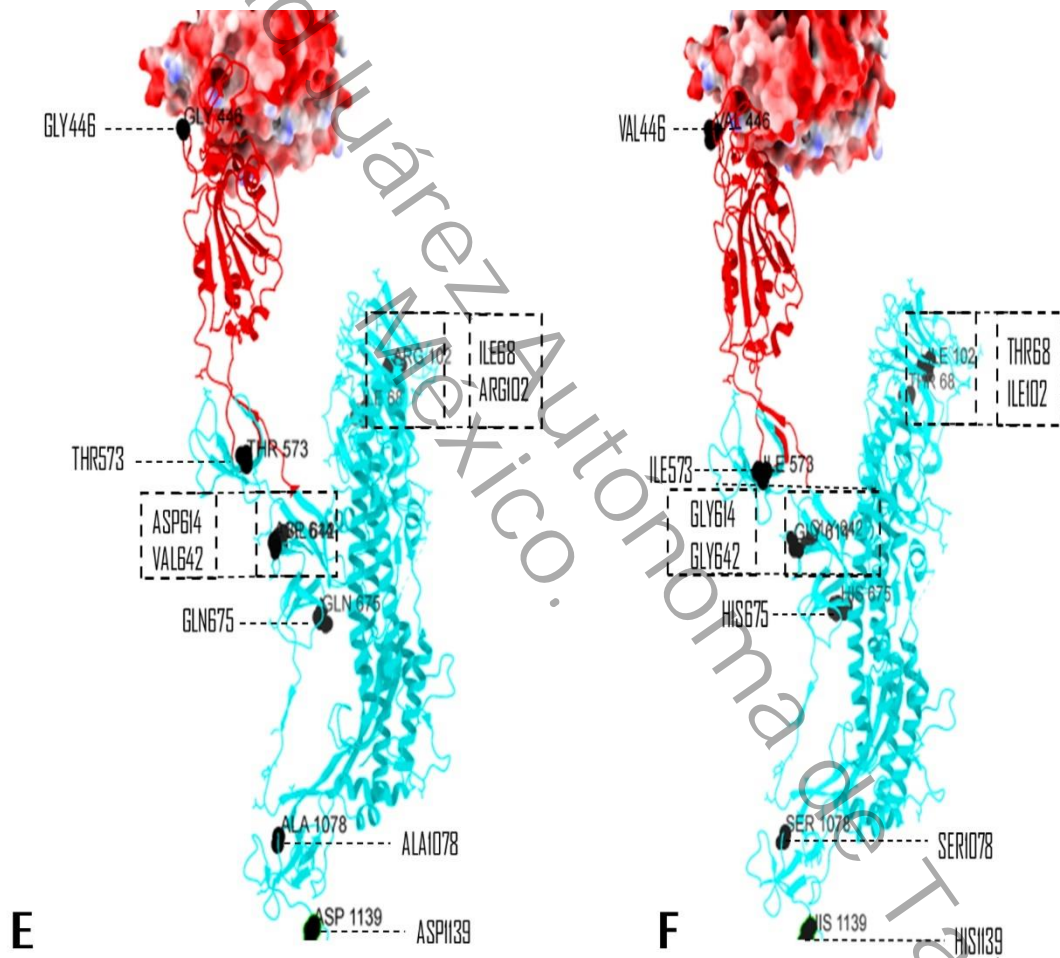


Figura 19. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 20C

En el panel E se muestra la conformación tridimensional de un monómero de la proteína S tridimensional (estructura original). Los sitios estructurales marcados de color negro representan el aminoácido que será sustituido. En el panel F, se muestra la estructura tridimensional del clado 20C, donde el sitio marcado de color negro ya está ocupado por otro aminoácido. Fuente: Este estudio.



En el clado 20G se encontró una media de mutaciones de 2.5 ± 0.5 . El 50% ($n = 2$) de las muestras que constituyeron este clado presentó 3 sustitución (D614G, G769V, A879S), como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 20G

Mutación	Frecuencia	Porcentaje
D614G, G769V, A879S	2	50.0%
D614G, P681H	1	25.0%
D614G, A879S	1	25.0%
Total	4	100.0%

Fuente: Este estudio.

Los cambios de aminoácidos en muestras del clado 20G se encuentran distribuidos en la subunidad S2. En la figura 20 se muestran los sitios de sustitución de aminoácido en la estructura tridimensional de un monómero de la proteína S.

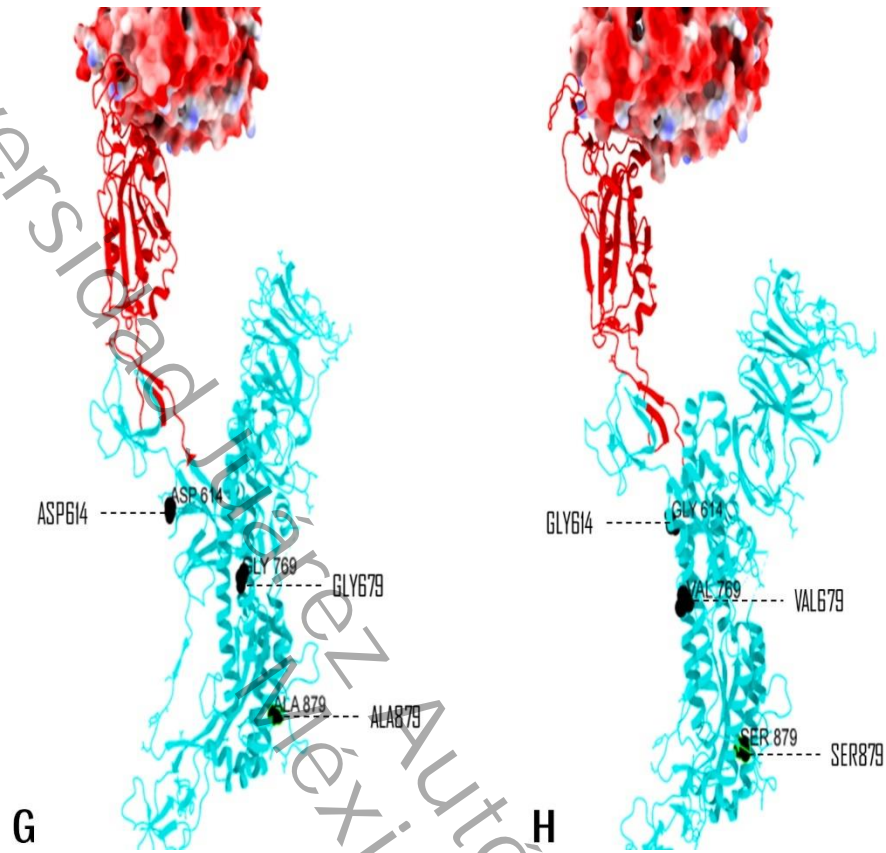


Figura 20. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 20G

En el panel G se muestra la conformación tridimensional de un monómero de la proteína S tridimensional (estructura original). Los sitios estructurales marcados de color negro representan el aminoácido que será sustituido. En el panel H, se muestra la estructura tridimensional del clado 20G, donde el sitio marcado de color negro ya está ocupado por otro aminoácido. Fuente: Este estudio.



En el clado 20I Alpha se encontraron 7 mutaciones. El 100% (n = 1) de las muestras presentó 7 sustituciones, como se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 20I Alpha

Mutación	Frecuencia	Porcentaje
N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H	1	100.0%
Total	1	100.0%

Fuente: Este estudio

Los cambios de aminoácidos en la muestra del clado 20I Alpha se encuentran distribuidos en todos los dominios funcionales de la proteína S. En la figura 21 se muestran los sitios de sustitución de aminoácido en la estructura tridimensional de un monómero de la proteína S.

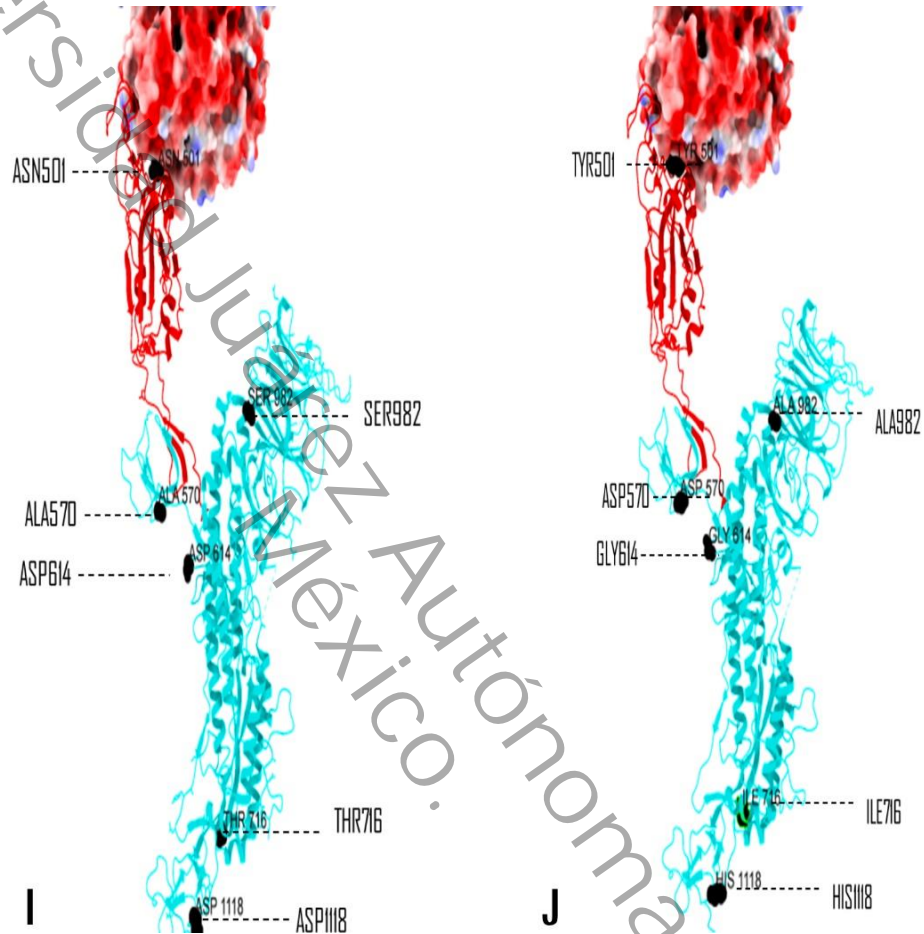


Figura 21. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 20I Alpha

En el panel I se muestra la conformación tridimensional de un monómero de la proteína S tridimensional (estructura original). Los sitios estructurales marcados de color negro representan el aminoácido que será sustituido. En el panel J, se muestra la estructura tridimensional del clado 20I Alpha, donde el sitio marcado de color negro ya está ocupado por otro aminoácido. Fuente: Este estudio.



En el clado 20J Gamma se encontró una media de 12.5 ± 0.5 mutaciones. El 42.3% ($n = 12$) de las muestras presentó 12 sustituciones, como se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 20J Gamma

Mutación	Frecuencia	Porcentaje
L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I, V1176F	3	42.9%
L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, S640F, H655Y, T1027I, V1176F	2	28.6%
L18F, T20N, P26S, G75V, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I, V1176F	1	14.3%
L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I, D1153Y, V1176F	1	14.3%
Total	7	100.0%

Fuente: Este estudio.

Los cambios de aminoácidos en las muestras del clado 20J Gamma se encuentran distribuidos en todos los dominios funcionales de la proteína S. En la figura 22 se muestran los sitios de sustitución de aminoácido en la estructura tridimensional de un monómero de la proteína S.

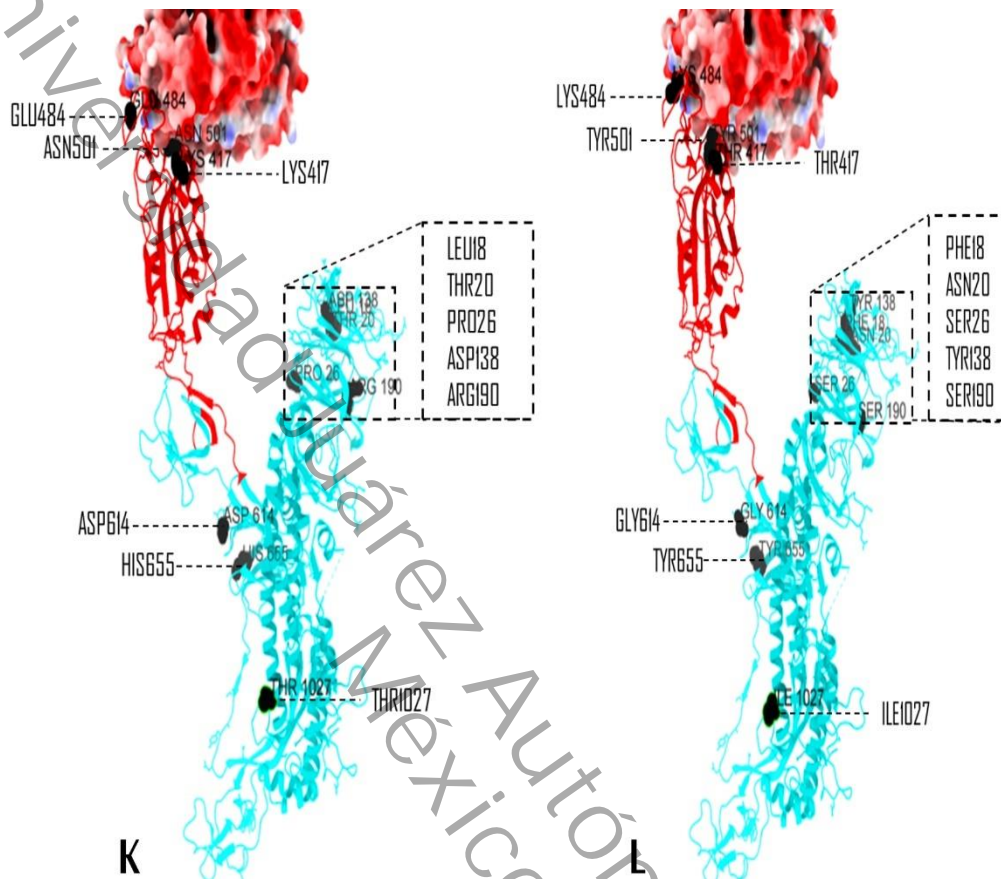


Figura 22. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 20J Gamma

En el panel K se muestra la conformación tridimensional de un monómero de la proteína S tridimensional (estructura original). Los sitios estructurales marcados de color negro representan el aminoácido que será sustituido. En el panel L, se muestra la estructura tridimensional del clado 20J Gamma, donde el sitio marcado de color negro ya está ocupado por otro aminoácido. Fuente: Este estudio.



En el clado 21C Épsilon se encontraron 4 mutaciones. El 100% (n=1) de las muestras presentó 4 sustituciones, como se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 21C Épsilon

Mutación	Frecuencia	Porcentaje
S13I, W152C, L452R, D614G	1	100.0%
Total	1	100.0%

Fuente: Este estudio.

Los cambios de aminoácidos en la muestra del clado 21C Épsilon se encuentran principalmente en el dominio S1 de la proteína S. En la figura 23 se muestran los sitios de sustitución de aminoácido en la estructura tridimensional de un monómero de la proteína S.

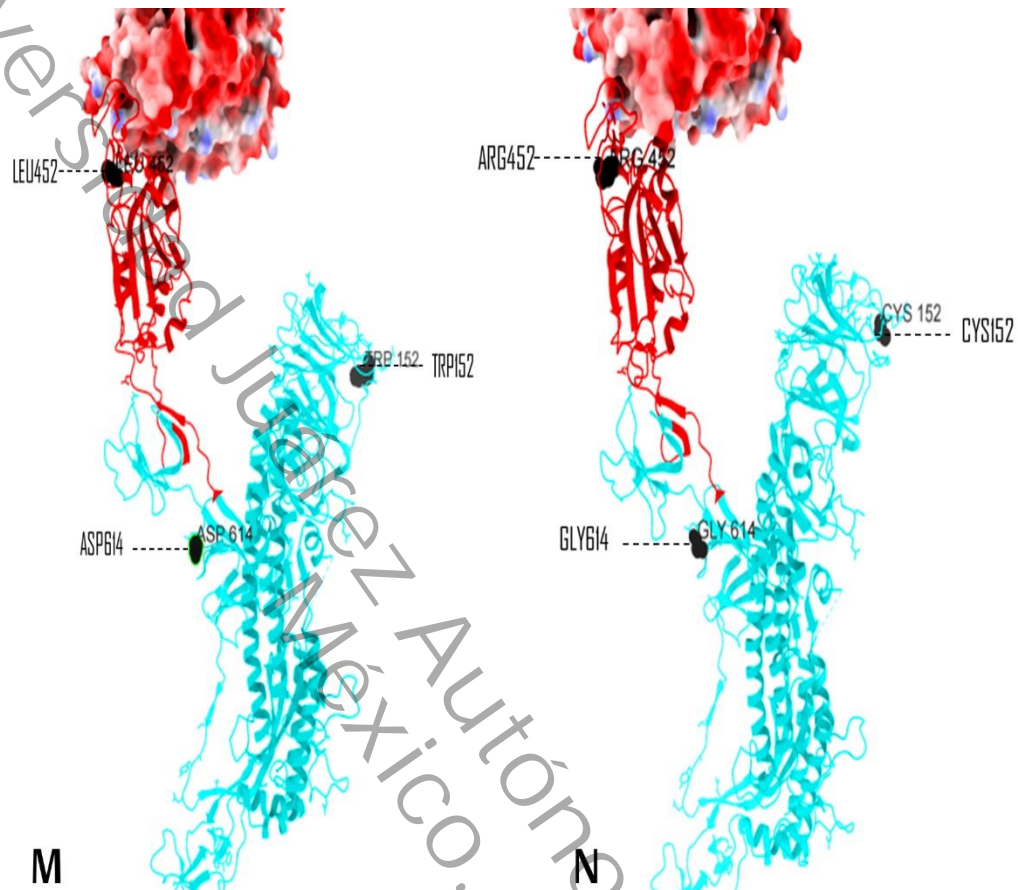


Figura 23. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 21C Épsilon

En el panel M se muestra la conformación tridimensional de un monómero de la proteína S tridimensional (estructura original). Los sitios estructurales marcados de color negro representan el aminoácido que será sustituido. En el panel N, se muestra la estructura tridimensional del clado 21C Épsilon, donde el sitio marcado de color negro ya está ocupado por otro aminoácido. Fuente: Este estudio.



En el clado 21G Lambda se encontró una media de 8.1 ± 0.8 mutaciones. El 71.4% ($n = 5$) de las muestras presentó 8 sustituciones (T20S, G75V, T76I, D253N, L452Q, F490S, D614G, T859N), como se muestra en la tabla 16.

Tabla 16. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 21G Lambda

Mutación	Frecuencia	Porcentaje
T20S, G75V, T76I, D253N, L452Q, F490S, D614G, T859N	5	71.4%
G75V, T76I, D253N, L452Q, F490S, D614G, T859N	1	14.3%
T20S, V70F, G75V, T76I, D253N, W258R, L452Q, F490S, D614G, T859N	1	14.3%
Total	7	100.0%

Fuente: Este estudio.

Los cambios de aminoácidos en las muestras del clado 21G Lambda se encuentran distribuidos en todos los dominios funcionales de la proteína S, con mayor frecuencia en la región NTD. En la figura 24 se muestran los sitios de sustitución de aminoácido en la estructura tridimensional de un monómero de la proteína S.

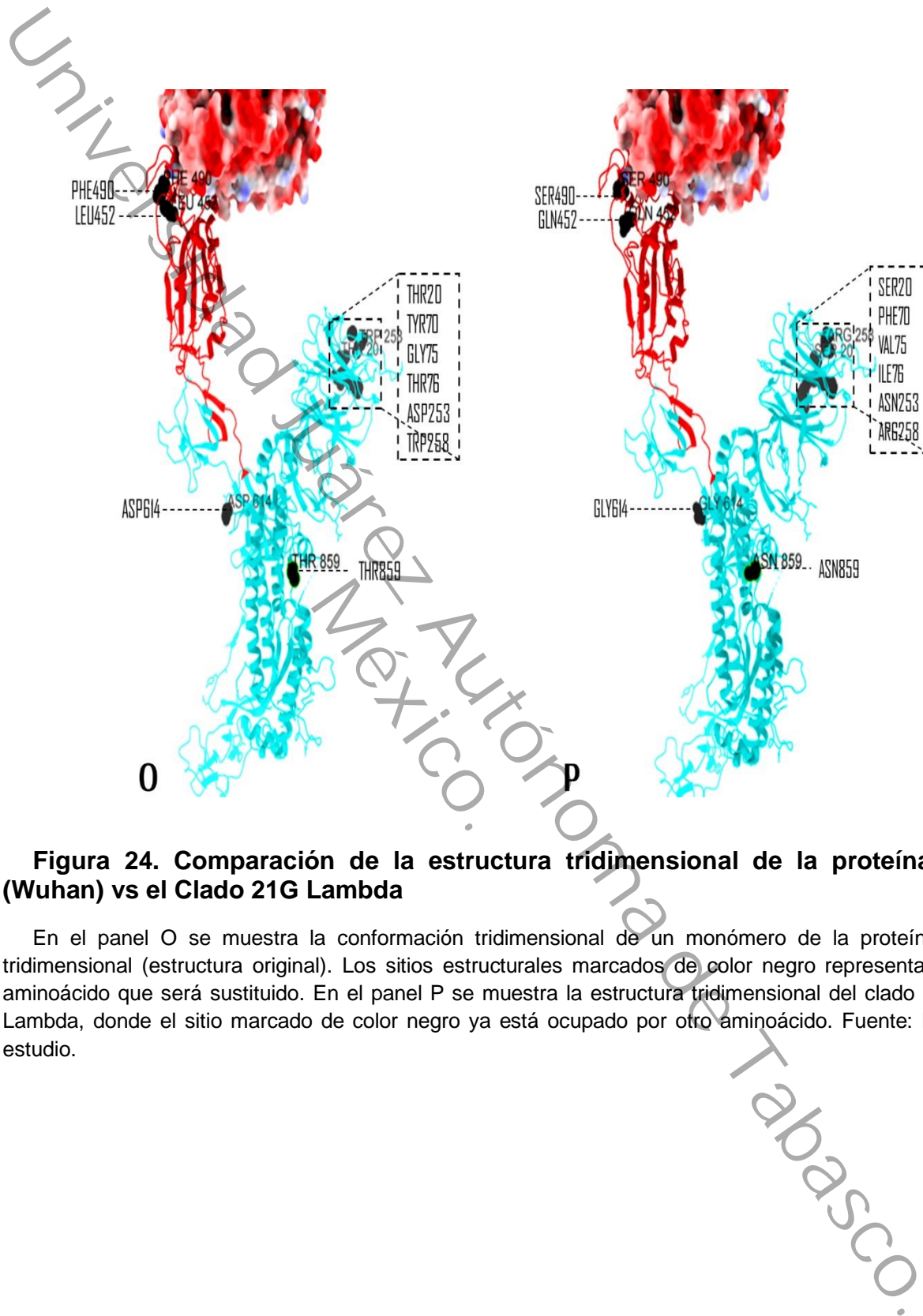


Figura 24. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 21G Lambda

En el panel O se muestra la conformación tridimensional de un monómero de la proteína S tridimensional (estructura original). Los sitios estructurales marcados de color negro representan el aminoácido que será sustituido. En el panel P se muestra la estructura tridimensional del clado 21G Lambda, donde el sitio marcado de color negro ya está ocupado por otro aminoácido. Fuente: Este estudio.



En el clado 21I Delta se encontró una media de 10.0 ± 0.5 mutaciones. El 71.4% ($n = 5$) de las muestras presentó 10 sustituciones (T19R, R158G, A222V, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, N1074S, V1264L), como se muestra en la tabla 17.

Tabla 17. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 21I Delta

Mutación	Frecuencia	Porcentaje
T19R, R158G, A222V, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, N1074S, V1264L	5	71.4%
T19R, R158G, A222V, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, V1264L	1	14.3%
T19R, R158G, A222V, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, N1074S, C1253F, V1264L	1	14.3%
Total	7	100.0%

Fuente: Este estudio.

Los cambios de aminoácidos en las muestras del clado 21I Delta se encuentran distribuidos en todos los dominios funcionales de la proteína S. En la figura 25 se muestran los sitios de sustitución de aminoácido en la estructura tridimensional de un monómero de la proteína S.

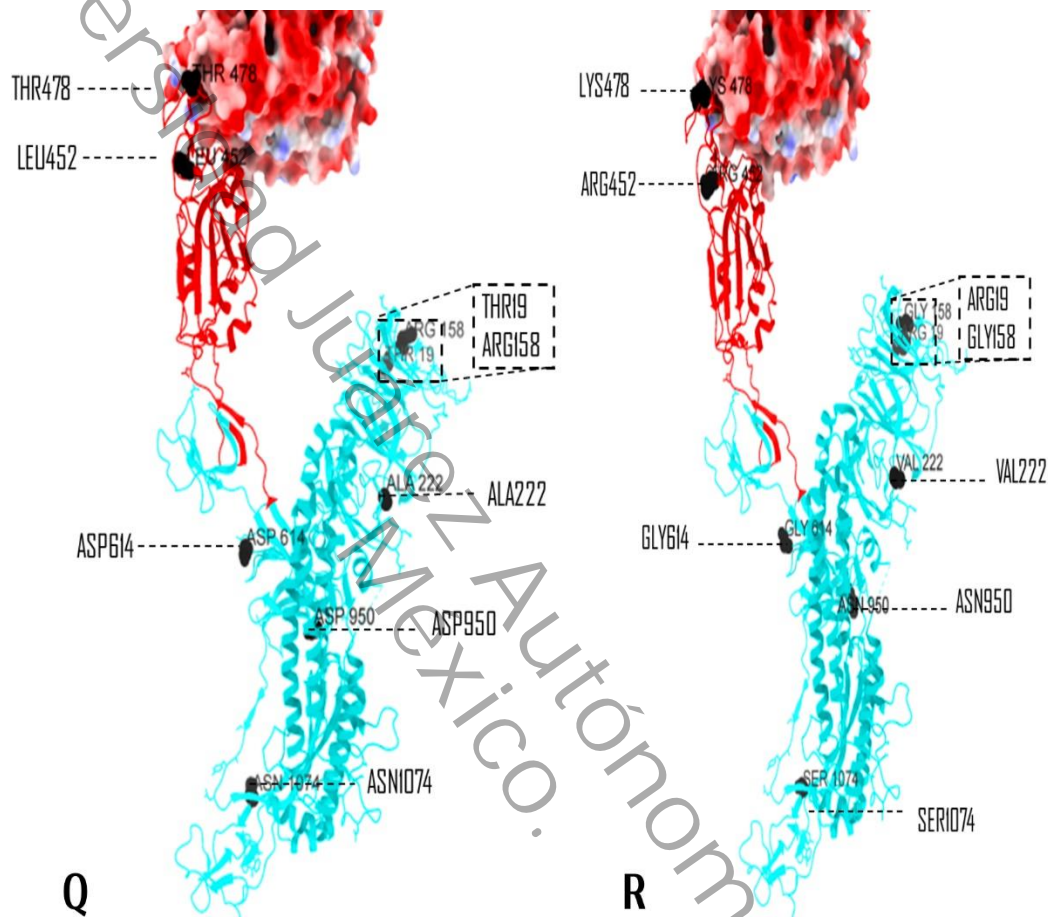


Figura 25. Comparación de la estructura tridimensional de proteína S (Wuhan) vs el Clado 211 Delta

En el panel Q se muestra la conformación tridimensional de un monómero de la proteína S tridimensional (estructura original). Los sitios estructurales marcados de color negro representan el aminoácido que será sustituido. En el panel R se muestra la estructura tridimensional del clado 211 Delta, donde el sitio marcado de color negro ya está ocupado por otro aminoácido. Fuente: Este estudio.



En el clado 21J Delta se encontró una media de 9.0 ± 0.8 mutaciones. El 45.5% ($n = 5$) de las muestras presentó 9 sustituciones (19R, T95I, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, V1104L), como se muestra en la tabla 18.

Tabla 18. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 21J Delta

Mutación	Frecuencia	Porcentaje
T19R, T95I, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, V1104L	5	45.5%
T19R, T95I, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N	2	18.2%
T19R, T95I, R158G, D228H, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N	1	9.1%
T19R, T95I, R158G, L452R, T478K, D614G, E654Q, P681R, D950N	1	9.1%
T19R, T95I, R158G, T299I, L452R, T478K, D614G, P681R, L922F, D950N	1	9.1%
T19R, T95I, K97E, R158G, D427V, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, V1104L	1	9.1%
Total	11	100.0%

Fuente: Este estudio.

Los cambios de aminoácidos en las muestras del clado 21J Delta se encuentran distribuidos en todos los dominios funcionales de la proteína S, con mayor frecuencia en la región NTD y en la subunidad S2. En la figura 26 se muestran los sitios de sustitución de aminoácido en la estructura tridimensional de un monómero de la proteína S.

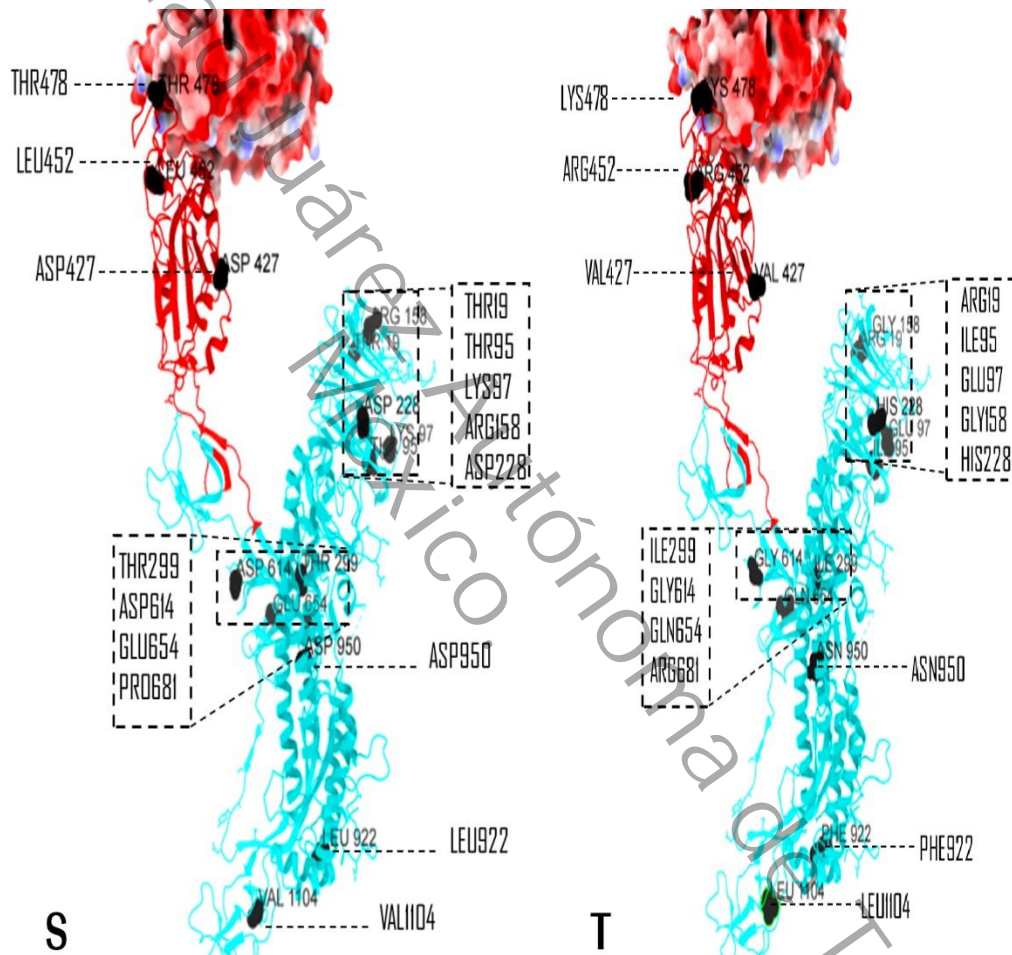


Figura 26. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 21J Delta

En el panel S se muestra la conformación tridimensional de un monómero de la proteína S tridimensional (estructura original). Los sitios estructurales marcados de color negro representan el aminoácido que será sustituido. En el panel T se muestra la estructura tridimensional del clado 21J Delta, donde el sitio marcado de color negro ya está ocupado por otro aminoácido. Fuente: Este estudio.



En el clado 21K Ómicron se encontró una media de 28.3 ± 3.4 mutaciones. El 35.8% (n = 19) de las muestras presentó 30 sustituciones (A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F), como se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Frecuencia de mutaciones en muestras del clado 21K Ómicron

Mutación	Frecuencia	Porcentaje
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	19	35.8%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	10	18.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	2	3.8%
A67V, T95I, Y145D, G339D, R346K, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, E484A, Q493R, G496S, Q498R, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, G446S, S477N, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%



T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F		
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, S477N, T478K, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, N440K, G446S, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, S371F, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, T604I, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, S:A831V, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, G446S, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, G446S, S477N, T478K, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y,	1	1.9%



Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F		
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, A701V, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, P384L, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
A67V, T95I, Y145D, V308L, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, S:N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	1	1.9%
Total	53	100.0%

Fuente: Este estudio.



Los cambios de aminoácidos en las muestras del clado 21K Ómicron se encuentran distribuidos en todos los dominios funcionales de la proteína S. En la figura 27 se muestran los sitios de sustitución de aminoácido en la estructura tridimensional de un monómero de la proteína S.

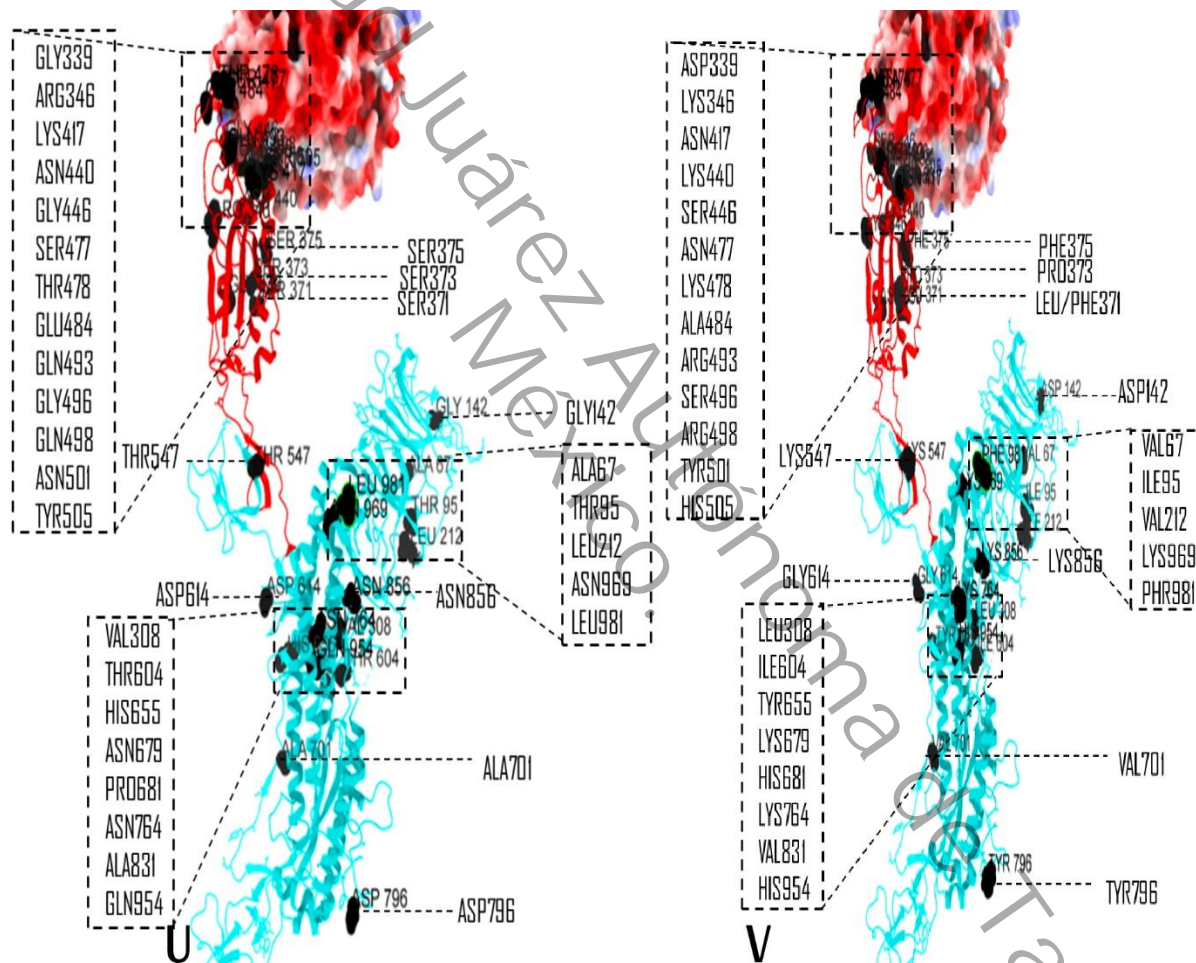


Figura 27. Comparación de la estructura tridimensional de la proteína S (Wuhan) vs el Clado 21K Ómicron

En el panel U se muestra la conformación tridimensional de un monómero de la proteína S tridimensional (estructura original). Los sitios estructurales marcados de color negro representan el aminoácido que será sustituido. En el panel V se muestra la estructura tridimensional del clado 21K Ómicron, donde el sitio marcado de color negro ya está ocupado por otro aminoácido. Fuente: Este estudio.

El esquema de la distribución de la proteína S se muestra en la figura 28, donde se representa la organización del genoma de la proteína S por clado circulante.

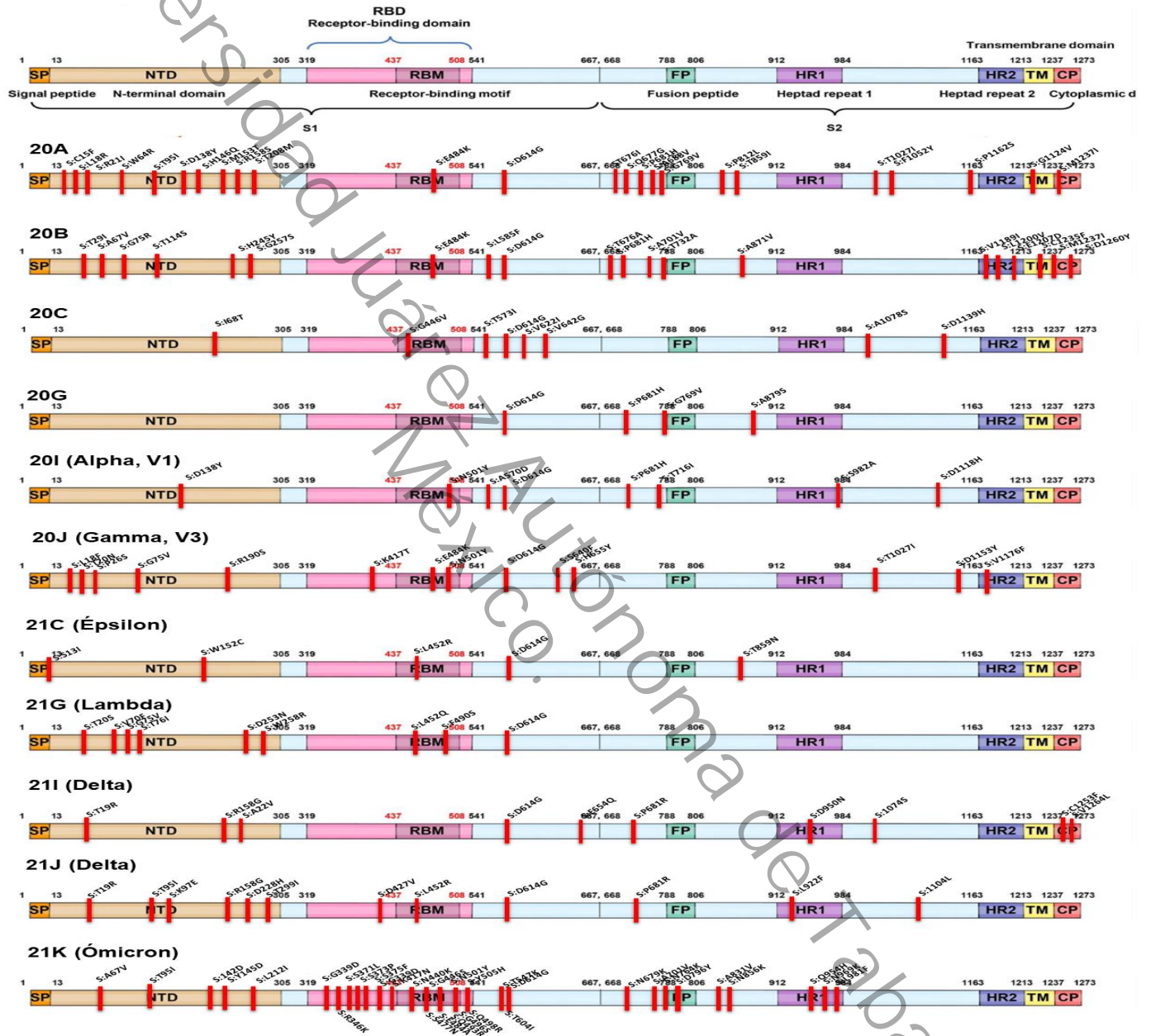


Figura 28. Mutaciones de los clados circulantes identificadas en muestras hospitalarias

Cada barra representa la estructura de la proteína S y las líneas verticales de color rojo el lugar de la mutación.



Para su análisis temporal se clasificaron de acuerdo con las olas pandémicas en México. De las 197 secuencias incluidas, el clado 20A ocasionó el 47.2% de las infecciones de la primera ola y fue disminuyendo hasta su desaparición en la tercera ola. En la tercera ola se observa mayor cantidad de clados circulantes, y en la cuarta ola pandémica el 94.6% de las infecciones fueron ocasionadas por el clado 21K (Ómicron) como se muestra en la figura 29.

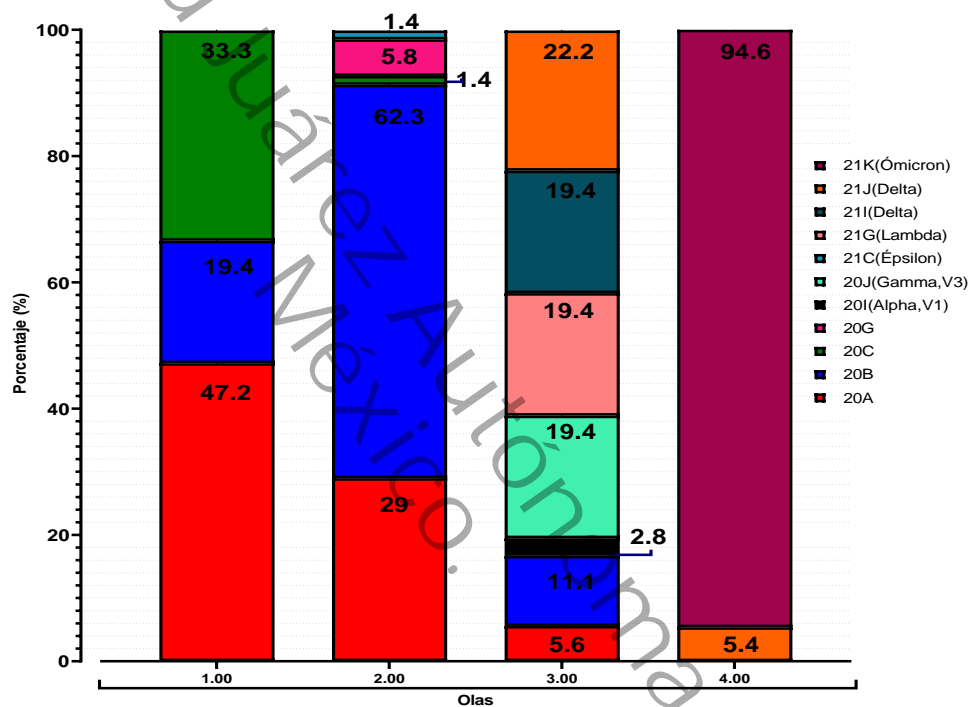


Figura 29. Distribución de clados a través del tiempo en pacientes hospitalizados en Tabasco

En el gráfico de barras acumuladas se representan las olas de pandemia en México en el eje de las X y el porcentaje que representa dentro de la ola en el eje de las Y. La columna 1 representa la distribución de clados durante la primera ola (semana epidemiológica 8 a la 39 de 2020), de color rojo se representa el clado 20A con 47.2%. La columna 2 representa la segunda ola (semana epidemiológica 40 del año 2020 a la 15 de año 2021), de color azul se representa el clado 20B con el 62.7% de infecciones durante el periodo. La columna 3 (semana epidemiológica 23 a la 42 de 2021) de color naranja se representa el clado 21J(Delta) con el 22.2% de infecciones durante el periodo. La columna 4 (semana epidemiológica 51 de 2021 a la 9 de 2022) de color púrpura se representa el clado 21K(Ómicron) con el 94.6% de infecciones durante el periodo. Fuente: Este estudio.



RELACIÓN DE VARIANTES CIRCULANTES DE SARS-CoV-2 CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El análisis de 197 casos por edad muestra que no hay diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.164$) entre los clados circulantes de SARS-CoV-2 como se observa en la figura 30.

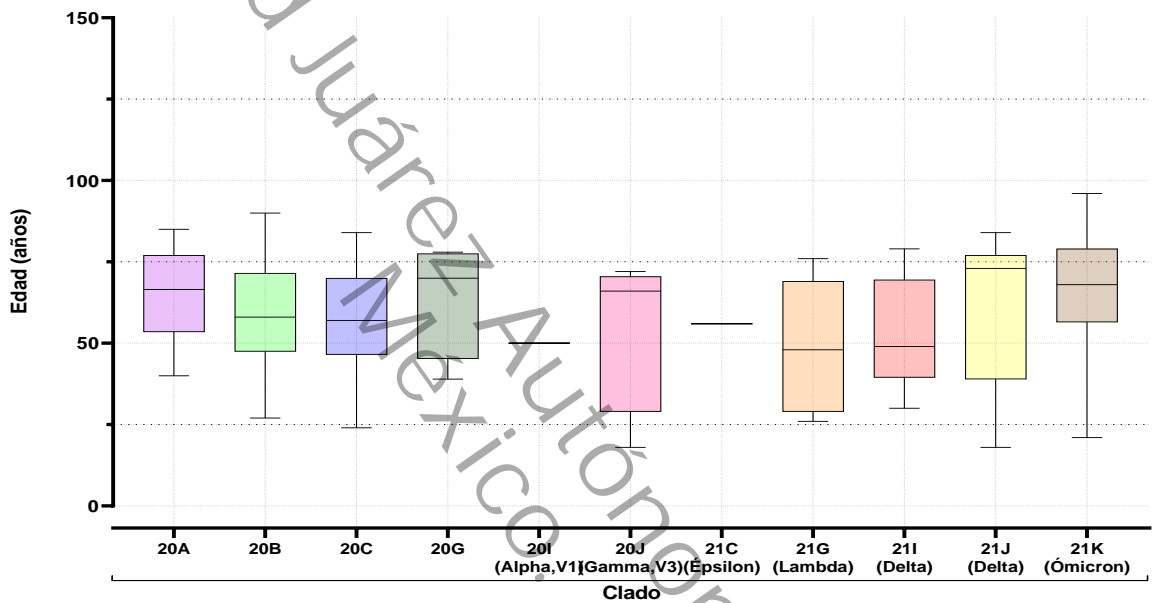


Figura 30. Media de edad por clados de SARS-CoV-2

Gráfico de caja con bigotes de la media de edad por clado. En el eje X se presenta el clado circulante de SARS-CoV-2 y en el eje Y de la media de edad. Cada figura muestra la media, el mínimo y el máximo de edad por clados. Fuente: Este estudio.

Al analizar la distribución de hombres y de mujeres por clados se observó que hay mayor frecuencia en hombres; sin embargo, los grupos no son estadísticamente distintos como se observa en la figura 31.

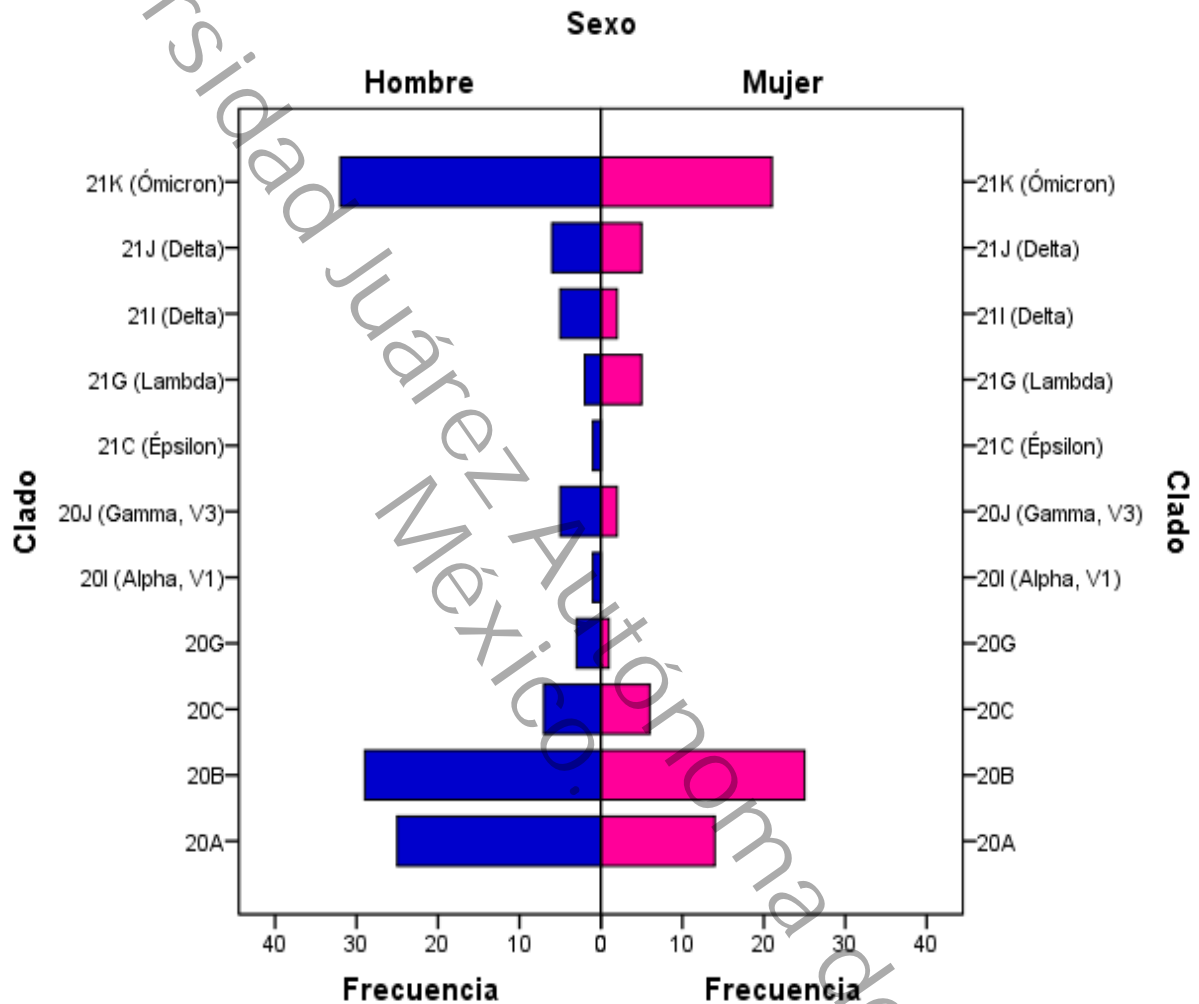


Figura 31. Distribución de clados de SARS-CoV-2 por sexo

Gráfico de barras de la distribución por clados distribuido por hombres y mujeres del Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús". Las barras color azul representan la frecuencia del clado en hombres y la barra color rosado en mujeres. Fuente: Fuente: Este estudio.



Las variables cuantitativas (cantidad de síntomas, de comorbilidades y parámetros de laboratorio) distribuido por clados circulantes de SARS-CoV-2 se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Características clínicas de los pacientes de acuerdo con clados circulantes de SARS-CoV-2

	20A (n=37)	20B (n=48)	20C (n=13)	20G (n=4)	20I Alpha (n=1)	20J Gamma V3 (n=5)	21C Épsilon (n=1)	21G Lambda (n=7)	21I Delta (n=4)	21J Delta (n=10)	21K Ómicron (n=47)	p
	\bar{X} ±EE	\bar{X} ±EE	\bar{X} ±EE	\bar{X} ±EE	\bar{X} ±EE	\bar{X} ±EE	\bar{X} ±EE	\bar{X} ±EE	\bar{X} ±EE	\bar{X} ±EE	\bar{X} ±EE	
Edad	64.5 ±2.2	59.1 ±2.1	57.6 ±4.4	64.2 ±8.9	50.0	53.0 ±10.4	56.0	50.2 ±7.4	53.4 ±8.0	60.0 ±6.5	66.7 ±2.4	0.095
DEIH	13.6 ±1.6	11.7 ±1.3	12.5 ±3.0	10.2 ±2.2	68.0	10.5 ±2.8	76.0	11.7 ±3.1	9.8 ±1.2	10.7 ±3.0	7.6 ±0.9*	0.212
Síntomas	6.6 ±0.4	6.3 ±0.4	8.7 ±1.0	6.7 ±1.1	13.0	5.8 ±0.2	4.0	7.4 ±1.4	5.0 ±0.5	6.5 ±0.7	5.5 ±0.3	0.069
Comorbilidades	1.4 ±0.1	1.2 ±0.1	1.6 ±0.3	1.7 ±0.4	1.0	1.0 ±0.4	2.0	1.2 ±0.7	1.0 ±0.5	0.6 ±0.1	1.3 ±0.1	0.382
Eritrocitos (10 ⁶ /µl)	4.3 ±0.1	4.4 ±0.08	4.3 ±0.2	4.6 ±0.6	5.1	4.7 ±0.1	5.2	4.4 ±0.3	5.1 ±0.1	4.3 ±0.2	3.6 ±0.1**	<0.000 1
Hemoglobina (g/dL)	12.7 ±0.4	13.0 ±0.2	12.5 ±0.6	13.7 ±1.3	15.6	14.5 ±0.4	14.4	13.1 ±0.9	14.7 ±0.5	13.1 ±0.6	10.5 ±0.4**	<0.000 1
Hematocrito (%)	38.5 ±1.1	39.9 ±0.6	38.1 ±1.9	41.3 ±4.6	45.3	42.3 ±1.1	43.8	38.6 ±2.8	44.2 ±1.5	38.9 ±1.8	32.2 ±1.4**	<0.000 1
Leucocitos (10 ³ /µl)	12.4 ±0.8	12.9 ±1.0	12.5 ±1.6	10.7 ±2.9	4.2	9.1 ±1.5	11.9	7.6 ±1.3	13.8 ±1.5	12.0 ±1.4	12.7 ±1.7	0.856
Trombocitos (10 ³ /µl)	291.3 ±48.6	246.8 ±15.9	207.7 ±18.84	231.3 ±30.3	157.0	166.3 ±10.6	166.0	213.4 ±37.21	236.1 ±46.1	262.5 ±36.9	235.7 ±20.7	0.733
Proteína C Reactiva	201.8 ±20.8	175.4 ±17.8	204.2 ±38.9	193.2 ±62.4	208.7	195.1 ±39.9	162.6	134.0 ±30.1	170.8 ±37.2	209.7 ±38.4	200.5 ±20.7	0.907
Glucosa (mg/dl)	193.3 ±18.9	188.9 ±14.5	210.9 ±49.8	151.8 ±28.9	112.0	161.7 ±25.8	241.0	128.1 ±7.8	181.6 ±40.1	127.3 ±16.1	169.9 ±12.1	0.448
Urea (mg/dl)	55.7 ±5.7	49.1 ±6.3	56.9 ±9.8	44.4 ±17.4	40.7	37.0 ±2.7	32.1	33.6 ±8.9	42.2 ±4.1	50.0 ±6.6	93.2 ±10.4**	0.000
BUN (mg/dl)	26.8 ±2.6	22.9 ±2.9	26.5 ±4.6	20.7 ±8.1	19.0	17.2 ±1.2	15.0	15.7 ±4.1	19.7 ±1.9	23.3 ±3.0	42.7 ±4.9*	0.001
Creatinina (mg/dL)	1.3 ±0.2	1.3 ±0.4	3.0 ±0.3	0.7 ±2.5	0.7	0.9 ±0.06	1.2	0.9 ±0.4	1.1 ±0.07	4.3 ±0.1	1.3 ±1.4	0.178
Na (mmol/L)	138.9 ±1.7	136.6 ±0.6	135.0 ±0.8	135.3 ±1.4	145.0	139.6 ±2.1	140.0	139.6 ±2.4	139.9 ±0.8	139.5 ±1.7	136.0 ±1.1	0.342
K (mmol/L)	4.5 ±0.1	4.5 ±0.1	4.4 ±0.2	4.2 ±0.2	4.1	4.1 ±0.3	4.8	4.5 ±0.1	4.7 ±0.3	4.3 ±0.1	4.7 ±0.1	0.678
Cl (mmol/L)	99.9 ±1.9	100.3 ±0.7	100.3 ±1.1	97.7 ±1.6	103.0	99.2 ±1.8	101.0	104.3 ±2.2	102.1±0.7	101.1 ±1.8	100.2 ±1.1	0.931
Bilirrubina total (mg/dl)	0.6 ±0.04	0.6 ±0.06	0.9 ±0.3	0.6 ±0.1	0.5	0.7 ±0.1	1.1	0.6 ±0.1	0.6 ±0.09	0.7 ±0.09	1.1 ±0.3	0.544
Bilirrubina Directa (mg/dl)	0.2 ±0.02	0.3 ±0.04	0.4 ±0.2	0.3 ±0.07	0.1	0.2 ±0.1	0.3	0.2 ±0.1	0.2 ±0.04	0.2 ±0.06	0.6 ±0.2	0.568



Bilirrubina Indirecta (mg/dl)	0.3 ±0.04	0.3 ±0.03	0.4 ±0.09	0.3 ±0.1	0.4	0.4 ±0.1	0.8	0.3 ±0.07	0.4 ±0.06	0.4 ±0.07	0.5 ±0.09	0.686
Proteínas totales (g/dL)	6.6 ±0.08	7.9 ±1.2	6.7 ±0.2	6.5 ±0.3	6.5	6.8 ±0.2	5.5	6.7 ±0.2	7.1 ±0.1	6.7 ±0.2	6.7 ±0.1	0.976
Albumina (g/dL)	3.5 ±0.06	3.5 ±0.08	3.5 ±0.2	3.4 ±0.4	3.9	3.7 ±0.2	2.8	3.6 ±0.3	3.8 ±0.07	3.5 ±0.1	3.4 ±0.08	0.883
Globulina (g/dL)	3.1 ±0.06	3.1 ±0.07	3.1 ±0.1	3.1 ±0.1	2.6	3.1 ±0.08	2.7	3.0 ±0.1	3.3 ±0.1	2.8 ±0.2	3.3 ±0.1	0.445
ALT (UI/L)	41.8 ±5.3	46.4 ±5.0	55.5 ±19.0	50.0 ±15.5	38.0	41.3 ±5.9	82.0	30.8 ±3.6	80.4 ±17.7	49.5 ±19.6	63.1 ±19.8	0.852
AST (UI/L)	53.0 ±4.0	53.8 ±3.9	62.5 ±13.3	56.5 ±10.3	43.0	63.6 ±15.3	78.0	50.2 ±5.9	80.5 ±15.3	142.1 ±83.9	110.1 ±43.5	0.586
FA (UI/L)	101.9 ±6.1	136.2 ±10.8	109.9 ±12.0	84.5 ±6.6	73.0	82.5 ±8.5	162.0	137.0 ±39.2	94.8 ±6.7	131.6 ±33.2	158.3 ±23.4	0.185
DHL (UI/L)	473.1 ±30.6	438.4 ±28.9	423.5 ±62.2	395.0 ±34.8	284.0	431.7 ±48.6	795.0	457.3 ±104.8	475.1 ±85.2	497.0 ±129.2	563.1 ±98.3	0.897
Fibrinógeno (mg/dl)	621.8 ±35.3	509.0 ±29.0	626.7 ±67.1	534.5 ±131.9	748.8	625.1 ±82.3	166.9	456.1 ±71.3	745.1 ±6.3	604.9 ±56.5	501.6 ±63.1	0.078
Dimero D (mg/L)	3.5 ±1.1	4.7 ±1.8	7.5 ±6.5	0.8 ±0.2	0.4	1.0 ±0.3	80.0	2.1 ±1.6	1.3 ±0.2	2.3 ±0.9	5.9 ±3.1	0.919
TP (Seg)	13.2 ±0.2	12.3 ±0.2	14.7 ±1.1	12.4 ±0.6	12.1	12.9 ±0.5	14.6	12.7 ±0.8	12.5 ±0.1	13.6 ±0.6	14.4 ±1.3	0.437
INR	1.0 ±0.02	1.0 ±0.01	1.2 ±0.1	1.0 ±0.08	0.9	1.0 ±0.04	1.1	1.0 ±0.07	1.0 ±0.01	1.1 ±0.05	1.2 ±0.1	0.290
TPTa (Seg)	30.9 ±1.2	34.1 ±3.2	34.1 ±3.0	34.9 ±1.7	33.5	34.1 ±2.4	25.2	36.2 ±4.0	28.2 ±0.7	33.3 ±2.7	39.2 ±3.0	0.700
Ferritina (ng/ml)	874.0 ±228.5	618.8 ±99.4	578.7 ±115.6	1009 ±275	572.0	789.3 ±149.6	698.0	476.4 ±87.5	678.7 ±169.7	953.1 ±364.2	812.0 ±199.8	0.899
Procalcitonin a (ug/L)	0.4 ±0.08	2.4 ±1.1	0.5 ±0.2	0.4 ±0.2	0.02	0.7 ±0.2	0.2	0.5 ±0.2	0.3 ±0.1	2.1 ±1.2	1.5 ±0.8	0.806
IL-6 (pg/ml)	97.1 ±24.0	170.5 ±35.0	195.4 ±117.4	110.8 ±83.1	33.2	71.6 ±26.2	308.0	59.9 ±35.8	135.4 ±95.3	178.4 ±107	191.1 ±71.8	0.7752

Abreviaturas: DEIH: Días de estancia intrahospitalaria BUN: Nitrógeno Ureico en Sangre; Na: Sodio; K Potasio; Cl: Cloro; ALT: alanino aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; FA: fosfatasa alcalina; DHL: Lactato deshidrogenasa, TP: Tiempo de protrombina, INR: Índice Internacional Normalizado, TPTa: Tiempo de tromboplastina parcial activado.

Prueba de ANOVA de una Vía, POST-HOC Dunnet *** $p > 0.0001$, * $p < 0.05$, No se consideraron los clados 20I (Alpha), ni 21C(épsilon) para el análisis de varianza debido a la frecuencia de pacientes en cada clado (n=1 paciente). Fuente: Este estudio.



Los síntomas y las comorbilidades por clado circulante de SARS-CoV-2 se resumen en la tabla 21.

Tabla 21. Síntomas y comorbilidades por clado circulante de SARS-CoV-2

	20A (n=37)	20B (n=48)	20C (n=13)	20G (n=4)	20I Alpha (n=1)	20J GammaV 3 (n=5)	21C Épsilon (n=1)	21G Lambda (n=7)	21I Delta (n=4)	21J Delta (n=10)	21K Ómicron (n=47)
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
Fiebre (n=128)	78.4% (n=29)	85.4% (n=41)*	61.5% (n=8)	75.0% (n=3)	100% (n=1)	40.0% (n=2)	100% (n=1)	71.4% (n=5)	75.0% (n=3)	90.0% (n=9)	55.3% (n=21)**
Tos (n=152)	86.5% (n=32)	95.8% (n=46)*	92.3% (n=12)	100% (n=4)	100% (n=1)	60.0% (n=3)	100% (n=1)	85.7% (n=6)	100% (n=4)	100% (n=10)	70.2% (n=33)***
Odinofagia (n=50)	45.9% (n=17)*	22.9% (n=11)	42.6% (n=6)	25.1% (n=1)	100% (n=1)	0% (n=0)	0% (n=0)	14.3% (n=1)	0% (n=0)	20.0% (n=2)	23.4% (n=11)
Disnea (n=134)	78.4% (n=29)	75% (n=36)	76.9% (n=10)	75.0% (n=3)	100% (n=1)	60.0% (n=3)	100% (n=1)	100% (n=7)	75.0% (n=3)	70.0% (n=7)	72.3% (n=34)
Diarrea (n=29)	21.6% (n=29)	14.6% (n=7)	30.8% (n=4)	0% (n=0)	100% (n=1)	0% (n=0)	0% (n=0)	28.6% (n=2)	50% (n=2)	20% (n=2)	6.4% (n=3)
Dolor torácico (n=55)	32.4% (n=12)	31.2% (n=15)	46.2% (n=6)	50.0% (n=2)	100% (n=1)	80.0% (n=4)*	0% (n=0)	0% (n=0)	25.0% (n=1)	30.0% (n=3)	17.0% (n=8)*
Cefalea (n=135)	73.0% (n=27)	83.3% (n=40)	69.2% (n=9)	75.0% (n=3)	100% (n=1)	80.0% (n=4)	100% (n=1)	71.4% (n=5)	75.0% (n=3)	70.0% (n=7)	74.5% (n=35)
Mialgias (n=83)	48.6% (n=18)	41.7% (n=20)	61.5% (n=8)	25.0% (n=1)	100% (n=1)	20.0% (n=1)	0% (n=0)	57.1% (n=4)	0% (n=0)	50.0% (n=5)	53.2% (n=25)
Artralgias (n=79)	37.8% (n=14)	43.8% (n=21)	53.8% (n=7)	25% (n=1)	100% (n=1)	40.0% (n=2)	0% (n=0)	42.3% (n=3)	0% (n=0)	60.0% (n=6)	51.1% (n=24)
Rinorrea (n=8)	17.0% (n=8)	22.9% (n=11)	68.5% (n=8)**	0% (n=0)	0% (n=0)	20.0% (n=1)	0% (n=0)	14.3% (n=1)	25.0% (n=1)	40.0% (n=4)	17.0% (n=8)
DM2 (n=64)	35.1% (n=13)	44.7% (n=21)	30.8% (n=4)	50.0% (n=2)	0% (n=0)	0% (n=0)	100% (n=1)	28.6% (n=2)	50.0% (n=2)	0% (n=0)**	40.4% (n=19)
HAS (n=78)	54.1% (n=20)	40.4% (n=19)	53.8% (n=7)	100% (n=4)**	100% (n=1)	20.0% (n=1)	0% (n=0)	28.6% (n=2)	50.0% (n=2)	10.0% (n=1)*	44.7% (n=21)
Obesidad (n=43)	45.9% (n=17)*	23.4% (n=11)	46.2% (n=6)	0% (n=0)	0% (n=0)	40.0% (n=2)	100% (n=1)	28.6% (n=2)	0% (n=0)	20.0% (n=2)	4.3% (n=2)*
ERC (n=14)	19.1% (n=9)*	4.3% (n=2)	7.7% (n=1)	25.0% (n=1)	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)	19.1% (n=9)*

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2, ERC: Enfermedad Renal Crónica

* $p < 0.05$, No se consideraron los clados 20I (Alpha), ni 21C(épsilon) para el análisis debido a la frecuencia de pacientes en cada clado (n=1 paciente). Fuente: Este estudio.



Finalmente, se comparó la gravedad de los casos, interpretado a través del motivo de egreso de los pacientes y los clados de SARS-COV-2. Entre el grupo de casos que fallecieron y los que mejoraron sólo el clado 20A fue estadísticamente diferente [defunción 71.8% (n = 28) vs mejoría 28.2% (n = 11) p = 0.028] como se observa en la figura 32.

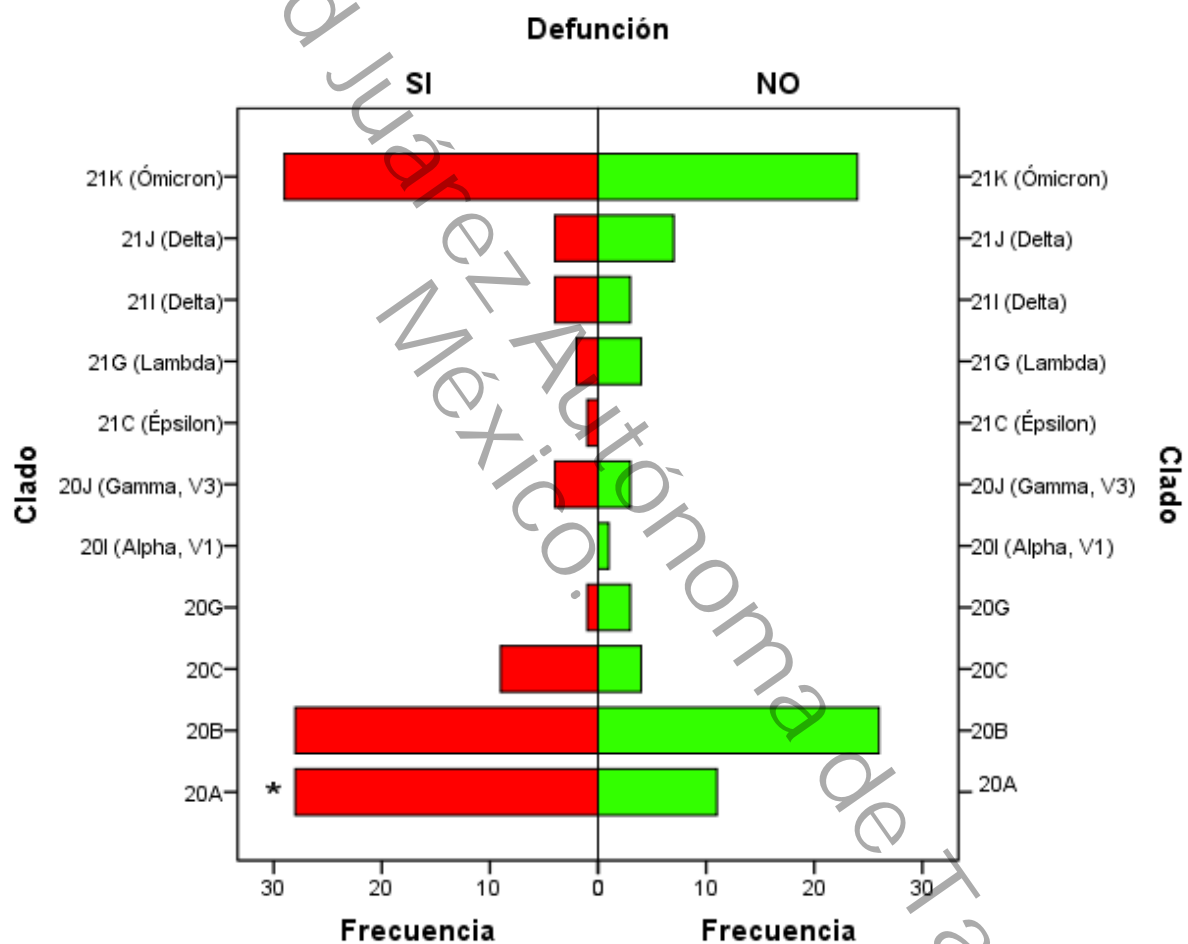


Figura 32. Distribución de clados de SARS-CoV-2 por gravedad de la enfermedad

Gráfico de barras de la distribución por clados separado por el tipo de desenlace. Las barras color rojo representan la frecuencia defunciones por clado y la barra verde el egreso por mejoría. Fuente: Este estudio.



DISCUSIÓN

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON COVID-19

En este estudio, analizamos de forma retrospectiva las características clínicas, hallazgos de laboratorio y desenlace de los adultos hospitalizados por COVID-19 en el Hospital Regional de Alta Especialidad “Juan Graham Casasús” durante el periodo de pandemia 2020-2022. Los resultados muestran que el grupo estuvo integrado principalmente por hombres adultos, de la séptima década de la vida, residentes de la capital del estado de Tabasco. Con respecto a las características clínicas, fiebre, tos, cefalea y disnea estuvieron presentes dos terceras partes de la población estudiada. Las principales enfermedades coexistentes fueron diabetes, hipertensión y obesidad. La media de estancia intrahospitalaria fue de 5 días y más del 50% de la población incluida murió.

Al inicio de la pandemia, Huang y colaboradores (2020) describieron los primeros 41 casos de neumonía de origen desconócido con conexión en Wuhan y encontraron que la mediana de edad era de 49 años, la mayoría hombres; el 32% tenía enfermedades subyacentes (diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares), los síntomas más comunes fueron fiebre, tos, mialgia y fatiga, los menos comunes fueron producción de esputo, dolor de cabeza, hemoptisis y diarrea (Huang *et al.*, 2020). Estos datos anteriores sugieren que la presentación clínica común de casos de COVID-19 inició con adultos menores a 60 años (Guan *et al.*, 2020; Shenoy *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2020). Sin embargo, en nuestro estudio se encontró



una media de edad mayor a 60 años y la proporción de hombres fue mayor que la de mujeres.

En el año 2020, una revisión que incluyó 7706 participantes categorizó los signos y síntomas de COVID-19 en sistémicas, respiratorias, gastrointestinales y cardiovasculares, y además sugiere que la tos, el dolor de garganta, la fiebre, las mialgias/artralgias, la fatiga y la cefalea son las únicas manifestaciones con una sensibilidad igual o mayor al 50% (Struyf *et al.*, 2020). Consistente con estos datos, el espectro en la presentación de la enfermedad en nuestro grupo de pacientes fue amplio, la media de síntomas fue de 6.4, y los síntomas con mayor frecuencia fueron fiebre, tos, cefalea, disnea.

De acuerdo con estudios anteriores la coexistencia de enfermedades crónicas fue alta, y las comorbilidades más frecuentes fueron hipertensión, diabetes y obesidad (Wang *et al.*, 2020). En un estudio donde exploran el efecto de la hipertensión en la progresión y pronóstico de los pacientes con COVID-19 de 2 hospitales de Wuhan encontraron una prevalencia de hipertensión menor al 40% (36.5) que se relaciona con la severidad de la enfermedad y la progresión comparado con los que no tienen diagnóstico de hipertensión (Huang *et al.*, 2020).

Las pruebas de rutina tratan de explicar la presentación clínica de los pacientes de COVID-19 y asesorar sobre el pronóstico del paciente. En este sentido, en los pacientes que integraron la muestra encontramos que el recuento de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito estaban por debajo del límite inferior y el recuento de leucocitos, neutrófilos, proteína C reactiva, glucosa, urea, nitrógeno ureico, creatinina, AST, fosfatasa alcalina, DHL, fibrinógeno, dímero D, ferritina, procalcitonina e IL-6



estaban por encima de los valores normales. Una revisión reciente menciona que a pesar de que no hay ningún biomarcador individual confiable, la disminución del recuento de linfocitos (Wang *et al.*, 2020), y aumento de marcadores inflamatorios como PCR e IL-6 tienen una especificidad y sensibilidad por encima del 50% (Safiabadi Tali *et al.*, 2021; Stegeman *et al.*, 2020). La procalcitonina y el dímero D son útiles para predecir la gravedad y la mortalidad en pacientes con COVID-19 (Shenoy *et al.*, 2022).

En nuestro estudio también reportamos que la media de días de estancia intrahospitalaria fue relativamente baja (5.6 días) y el número de muertes fue cercano al 60% de la población incluida. Curiosamente, otros estudios reportaron una tasa de fatalidad baja al inicio (Guan *et al.*, 2020) y en el transcurso (Shenoy *et al.*, 2022) de la pandemia.

ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA S DEL VIRUS SARS-CoV-2

En este estudio retrospectivo analizamos secuencias de la proteína S de SARS-CoV-2 recolectadas de 197 pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” del periodo junio de 2020 a diciembre 2022 donde se encontró que circularon 11 clados en Villahermosa, Tabasco, México, además de que tenían importantes cambios de aminoácidos.

Para nuestro conocimiento, este estudio representa la primera investigación sobre los cambios de aminoácidos en la proteína S en muestras de pacientes hospitalizados del estado de Tabasco. En general reportamos 121 mutaciones, y con respecto al análisis individual, el clado 20A, 20B y 21K (Ómicron) presentan la mayor frecuencia de cambios de aminoácidos.



Nuestros datos junto con informes recientes muestran que la persistencia de la pandemia acumuló cambios en la traducción de proteínas que conducen a su inestabilidad funcional, estos cambios a menudo se atribuyen a alteraciones estructurales favorables en los residuos de aminoácidos, considerado como la evolución y adaptación del virus a su entorno (Prasetyoputri *et al.*, 2022). Nos sorprendió que la sustitución D614G estuvo presente en todas las muestras, hecho que coincide con los reportes de otros países (Ghanchi *et al.*, 2021; Yavarian *et al.*, 2022) que nos permite suponer que esta ventaja evolutiva marca el inicio del descontrol de la pandemia en nuestra región, evidenciado por el incremento de la transmisión, hospitalización y número de muertes.

Hasta la fecha, el impacto de las mutaciones de la proteína S se estudia extensivamente. En la búsqueda de estos cambios que confieren ventajas al virus SARS-CoV-2 encontramos la sustitución de una serina por una isoleucina en el residuo 13 (S13I en el clado 21C, Épsilon). En cuanto a la literatura disponible Zhang y colaboradores mostraron que este cambio en la región del péptido señal sólo está presente en el clado 21C Épsilon y juega un rol importante en la expresión, modificación y secreción del virus SARS-CoV-2 con consecuencias sobre la integridad del dominio NTD y la evasión inmune (Zhang *et al.*, 2022).

En el dominio NTD (residuo 14-305) localizamos una gran cantidad de mutaciones que favorecen la infectividad, y que reducen la neutralización de anticuerpos monoclonales (Zhang *et al.*, 2022), a través de cambios en la conformación de los bucles β 3- β 4 (residuo 17-80), β 9- β 10 (residuo 142-157) y β 14- β 15 (residuo 241-253)



(Klinakis *et al.*, 2021). Tal es el caso de la sustitución del aminoácido cisteína por el aminoácido no polar aromático fenilalanina en el residuo 15 (C15F Clado 20A) que incrementa la infectividad (Zhang *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido no polar alifático leucina por un aminoácido polar positivo arginina (L18R, Clado 20A) o por el aminoácido no polar aromático fenilalanina en el residuo 18 (L18F, Clado 20J Gamma, V3), da ventaja replicativa y se ha identificado en el 10% de muestras (Grabowski *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido polar neutro treonina por el aminoácido no polar alifático alanina en el residuo 19 (T19R Clado 21I, Delta, 21J, Delta) que participa en el escape a la respuesta de anticuerpos (Mahmood *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022), la sustitución del aminoácido polar neutro treonina por el aminoácido polar neutro asparagina (T20N Clado 20J Gamma, V3) o por el aminoácido polar neutro serina (T20S 21G, Lambda) en el residuo 20 no altera el entorno pero influye en la capacidad global de unión (Gupta *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido prolina por el aminoácido polar neutro serina en el residuo 26 (P26S Clado 20J Gamma, V3) contribuye en la evasión inmune (Asif *et al.*, 2022; Salleh *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido polar neutro treonina por el aminoácido no polar alifático isoleucina en el residuo 29 (T29I Clado 20B, que de acuerdo con su capacidad de interacción con el agua supone el paso de un aminoácido hidrofílico por uno hidrofóbico y la sustitución del aminoácido no polar aromático triptófano por el aminoácido polar positivo arginina (W64R Clado 20A) que no ha sido asociado con cambios en el fenotipo de la proteína.

En el bucle $\beta 3$ - $\beta 4$ encontramos 6 sustituciones. La sustitución del aminoácido no polar alifático alanina por el aminoácido no polar alifático valina en la posición 67 (A67V Clado 20B, 21K Ómicron) asociado con el establecimiento de nuevas interacciones



hidrofóbicas (Klinakis *et al.*, 2021). La sustitución de glicina por el aminoácido polar positivo arginina (G75R Clado 20B) o por el aminoácido no polar alifático valina (G75V Clado 20J Gamma, V3) en el residuo 75, reduce la infectividad viral (Kimura *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar neutro treonina por el aminoácido no polar alifático isoleucina en el residuo 76 (T76I 21G, Lambda) ubicada adyacente al bucle flexible, describe una actividad compensatoria al incrementar la infectividad (Kimura *et al.*, 2022). También, la sustitución del aminoácido no polar alifático isoleucina por el aminoácido polar neutro treonina en el residuo 68 (I68T Clado 20C), y la sustitución del aminoácido no polar alifático valina no polar alifático por el aminoácido no polar aromático fenilalanina en el residuo 70 (V70F 21G, Lambda), no han sido asociadas con cambios en el fenotipo de la proteína S.

La sustitución del aminoácido polar neutro treonina por el aminoácido no polar alifático isoleucina en el residuo 95 (T95I Clado 20A, 21J Delta, 21K Ómicron) está asociada con mayor carga viral en aparición conjunta de G142D (Shen *et al.*, 2021), identificada en genomas de los clados Delta (De Marco *et al.*, 2022) y Ómicron (Zhang *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido no polar alifático lisina por el aminoácido polar negativo ácido glutámico en el residuo 97 (K97E Clado 21J Delta) ha sido encontrado frecuentemente en muestras mexicanas (Taboada *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar negativo ácido aspártico por el aminoácido no polar aromático tirosina en el residuo 138 (D138Y Clado 20A, 20J Gamma, V3), junto con L18F y T20N, forman múltiples interacciones que estabilizan la conformación de la proteína (Mannar *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar positivo arginina por el aminoácido no polar alifático isoleucina en el residuo 102 (R102I Clado 20C), y



la sustitución del aminoácido polar neutro treonina por el aminoácido polar neutro serina en el residuo 114 (T114S Clado 20B) no han sido asociadas con cambios en el fenotipo de la proteína S.

En el bucle $\beta 9-\beta 10$ encontramos la sustitución del aminoácido no polar aromático tirosina por el aminoácido polar negativo ácido aspártico en el residuo 145 (Y145D Clado 21K, Ómicron) que incrementa la evasión a los anticuerpos, común en la variante Ómicron. La sustitución del aminoácido no polar aromático triptófano por el aminoácido cisteína en el residuo 152 (W152C Clado 21C, Épsilon) contribuye con el incremento de la infectividad de las variantes que portan la mutación L452R (Ai *et al.*, 2020), que está relacionada con la variante épsilon. En esta región la sustitución del aminoácido polar neutro histidina por el aminoácido polar neutro glutamina en el residuo 146 (H146Q Clado 20A) y la sustitución del aminoácido metionina por el aminoácido polar neutro treonina en el residuo 153 (M153T Clado 20A). no se ha asociados con cambios en el fenotipo

La sustitución del aminoácido polar positivo arginina por el aminoácido polar neutro serina por (R158S Clado 20A), o por el aminoácido glicina en el residuo 158 (R158G Clado 21I, Delta, 21J, Delta) aumenta la hidrofobicidad (Mahmood *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar positivo arginina por el aminoácido polar neutro serina en el residuo 190 (R190S Clado 20J Gamma, V3) está reportada con alta frecuencia, y contribuye con la disminución de la actividad neutralizante en presencia de L18F, T20N y D138Y. La sustitución del aminoácido polar neutro treonina por el aminoácido metionina en el residuo 208 (T208M Clado 20 A) y la sustitución del aminoácido no



polar alifático leucina por el aminoácido no polar alifático isoleucina en el residuo 212 L212I (Clado 21K, Ómicron) no están asociadas con cambios en el fenotipo de la proteína S. La sustitución del aminoácido no polar alifático alanina por el aminoácido no polar alifático valina en el residuo 222 (A222V Clado 21I, Delta) promueve una mayor apertura de RBD y aumenta ligeramente la unión de ACE2 (Ginex *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar negativo ácido aspártico por el aminoácido polar neutro histidina en el residuo 228 (D228H Clado 21J, Delta) está presente en muestras del clado delta.

En el bucle β 14- β 15 encontramos dos mutaciones. La sustitución del aminoácido polar neutro histidina por el aminoácido no polar aromático tirosina en el residuo 245 (H245Y Clado 20B), La sustitución del aminoácido polar negativo ácido aspártico por el aminoácido polar neutro arginina en el residuo 253 (D253N 21G, Lambda) aumenta la transmisibilidad y la infección de las variantes (Moghaddar *et al.*, 2021).

La sustitución del aminoácido polar neutro una treonina por el aminoácido no polar alifático isoleucina en el residuo 299 (T299I Clado 21J, Delta), se asocia con consecuencias funcionales de la proteína S como la estabilización estructural de las mutantes que la poseen, y el incremento de la flexibilidad (El Mazouri *et al.*, 2022; Salleh *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido glicina por el aminoácido polar neutro serina en el residuo 257 (G257S Clado 20B) y la sustitución del aminoácido no polar aromático triptófano por el aminoácido polar positivo arginina en el residuo 258 (W258R 21G, Lambda) no están descritas.



El dominio de unión al receptor (RBD) (319-541) es el más estudiado ya que los cambios en este sitio le confieren ventajas selectivas. En nuestro análisis encontramos que el Clado 21K Ómicron es el que tiene mayor cantidad de mutaciones en esta región, mientras que el Clado 20G no presentó ninguna. La sustitución del aminoácido glicina por el aminoácido polar negativo ácido aspártico en el residuo 339 (G339D Clado 21K, Ómicron) afecta el rendimiento de la neutralización de un subconjunto de anticuerpos (Saito *et al.*, 2022) La sustitución del aminoácido polar positivo arginina por el aminoácido no polar alifático lisina en el residuo 346 (R346K Clado 21K, Ómicron) favorece el escape inmune debido a que la sustitución ocasiona un acortamiento en la cadena lateral que incrementa la afinidad de RBD-ACE2 (Al-Khatib *et al.*, 2022; Koyama *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar neutro serina por el aminoácido no polar aromático fenilalanina (S371F Clado 21K, Ómicron) o por el aminoácido hidrofóbico no polar leucina (S371L Clado 21K, Ómicron) en el residuo 371 favorecen la neutralización de anticuerpos (Wang *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar neutro serina por el aminoácido prolina en el residuo 373 (S373P Clado 21K, Ómicron) no está presente en las secuencias antiguas de ómicron (Wang *et al.*, 2022) pero La sustitución del aminoácido serina por el aminoácido no polar aromático fenilalanina en el residuo 375 (S375F Clado 21K, Ómicron) determina la eficacia de escisión, la fusogenicidad y la afinidad de unión a ACE2 (Wang *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar positivo lisina por el aminoácido polar neutro asparagina (K417N Clado 21K, Ómicron) o treonina (K417T Clado 20J Gamma, V3) en el residuo 417, potencia la infectividad y resistencia a la neutralización (Kuzmina *et al.*, 2021). La sustitución el aminoácido polar negativo ácido aspártico por el



aminoácido no polar alifático valina en el residuo 427 (D427V Clado 21J Delta), no ha sido asociado con cambios en el fenotipo.

En el motivo de unión al receptor RBM (residuo 436 -506) se encontró la sustitución del aminoácido polar neutro asparagina aminoácido polar positivo lisina en el residuo 440 sustitución (N440K Clado 20A, 21K Ómicron) aumenta la reinfección y disminuye la eficacia de la vacunación (Kullappan *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido glicina por el aminoácido polar neutro serina (G446S Clado 21K, Ómicron) o por el aminoácido no polar alifático valina (G446V, Clado 20C) en el residuo 446 afecta el procesamiento/presentación de antígenos y potencia la actividad antiviral (Cao *et al.*, 2022; Motozono *et al.*, 2022), particularmente G446V es parte del bucle 443-450 que causa disminución en la unión y neutralización de anticuerpos plasmáticos (Greaney *et al.*, 2021), además incrementa la afinidad y la infectividad de las variantes (Hanifa *et al.*, 2022).

Un grupo de aminoácidos están identificadas como punto de acceso (Saha *et al.*, 2021), como es el caso de la sustitución del aminoácido polar alifático leucina por el polar positivo arginina en el residuo 452 (L452R Clado 21C, Épsilon, Clado 21I, Delta, 21J, Delta) que aumenta significativamente la entrada del virus al estabilizar la interacción con el receptor ACE2 (Ai *et al.*, 2020) y cuando se sustituye con el aminoácido no polar alifático glutamina (L452Q Clado 21G, Lambda) aumenta significativamente la infectividad viral y la afinidad al receptor, además confiere resistencia a la inmunidad antiviral (Kimura *et al.*, 2022). La del aminoácido polar neutro serina por el aminoácido polar neutro asparagina en el residuo 477 sustitución



(S477N Clado 21K, Ómicron) incrementa la afinidad por ACE2 (Mondeali *et al.*, 2023). La sustitución del aminoácido treonina por el aminoácido polar positivo lisina en el residuo 478 (T478K Clado 20B, Clado 21I Delta, 21J Delta, 21K Ómicron) aumenta el potencial electrostático de la proteína S a una superficie más positiva (Di Giacomo *et al.*, 2021), juega un rol importante en la transmisibilidad (Massi *et al.*, 2023), además contribuyen en la evasión inmune (Wilhelm *et al.*, 2021). Frecuentemente coexiste con otras tres mutaciones, D614G, P681H y T732A (Di Giacomo *et al.*, 2021).

La sustitución del aminoácido polar negativo ácido glutámico por el aminoácido polar positivo lisina en el residuo 484 (E484K Clado 20A, 20B, 20J Gamma, V3) ayuda al virus a evadir los anticuerpos neutralizantes, incrementa la afinidad de unión al ACE2 (Nelson *et al.*, 2021; Tegally *et al.*, 2021), además incrementa la transmisibilidad viral (Salehi-Vaziri *et al.*, 2022). Cuando se sustituye por el aminoácido no polar alifático alanina (E484A 21K, Ómicron) también se observa una disminución de la neutralización por anticuerpos (Peter *et al.*, 2022).

También encontramos en RBD la sustitución de del aminoácido no polar aromático fenilalanina por el aminoácido polar neutro serina en el residuo 490 (F490S Clado 21G, Lambda) a pesar de que no está en contacto directo con el receptor ACE2, confiere resistencia a la inmunidad antiviral (Kimura *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar neutro glutamina por el aminoácido polar positivo arginina en el residuo 493 (Q493R Clado 21K, Ómicron) confiere resistencia a anticuerpos (Liu *et al.*, 2022), la sustitución del aminoácido glicina por el aminoácido polar neutro serina en el residuo 496 (G496S Clado 21K, Ómicron) compromete la capacidad de replicación del virus



(Liang *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar neutro glutamina por el aminoácido polar positivo arginina en el residuo 498 (Q498R Clado 21K, Ómicron) reduce la afinidad de los anticuerpos monoclonales (Chakraborty *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar neutro asparagina por el aminoácido no polar aromático tirosina en el residuo 501 (N501Y 20I Alpha V1, Clado 20J Gamma, V3, 21K, Ómicron) es una de las mutaciones más importantes en RBD, debido a que incrementa la interacción de la proteína S con el receptor ACE2 del huésped (Salehi-Vaziri *et al.*, 2022), además, afecta la transmisibilidad, la patogenicidad y la eficacia de la vacuna (Tian *et al.*, 2021). El último cambio en esta región es la sustitución del aminoácido no polar tirosina por el aminoácido polar positivo histidina en el residuo 505 (Y505H Clado 21K, Ómicron) responsable de la pérdida de afinidad de unión de anticuerpos (Chakraborty *et al.*, 2022).

En los residuos 542-685 encontramos la sustitución D614G, la primera mutación identificada en muestras de la segunda ola definida entre junio y septiembre de 2020 (Yavarian *et al.*, 2022), donde se presenta el cambio del aminoácido polar negativo ácido aspártico por el aminoácido glicina que disminuye la estabilidad y cambia la conformación de la proteína S, trae como consecuencia la mejora en la capacidad de unión al receptor, la reducción del desprendimiento y el aumento de la infectividad (Zella *et al.*, 2021). En esta región se identificaron otras mutaciones como la sustitución del aminoácido polar neutro treonina por el aminoácido polar positivo lisina en el residuo 547 (T547K Clado 21K, Ómicron), que en presencia de la mutación L981F, estabilizan el RBD y mejoran la interacción hidrofóbica, brindando una mayor estabilidad de la estructura (Zeng *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido no polar



alifático alanina por el aminoácido polar negativo ácido aspártico en el residuo 570 (A570D Clado 20I Alpha, V1) incrementa la afinidad con el receptor ACE2 (Ray, Le, & Andricioaei, 2021), introduce un interruptor molecular que modula la apertura y el cierre de RBD, además se encuentra muy cerca del sitio de mutación D614G y contribuye a la infectividad de las variantes que la contienen (Yang *et al.*, 2021).

La sustitución del aminoácido polar neutro treonina por un no polar alifático isoleucina en el residuo 573 (T573I Clado 20C), induce la estabilidad estructural, aumenta la magnitud de los movimientos de proteína en la subunidad 1; además, las secuencias de la proteína S informadas en la población mexicana van acompañadas por H49Y y D614G (Sixto-López *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido no polar alifático leucina por el aminoácido no polar aromático fenilalanina en el residuo 585 (L585F Clado 2B) y la sustitución del aminoácido polar neutro treonina por el aminoácido no polar alifático isoleucina en el residuo 604 (T604I Clado 21K, Ómicron), no tienen una atribución de cambios en el fenotipo.

La sustitución del aminoácido no polar alifático valina por el aminoácido no polar alifático isoleucina en el residuo 622 (V622I Clado 20C) disminuye la flexibilidad, La sustitución del aminoácido polar neutro serina por el aminoácido no polar aromático fenilalanina en el residuo 640 (S640F Clado 20J Gamma, V3), la sustitución de una serina polar neutro por una fenilalanina no polar aromático en el residuo 640, (V642G clado 20G), la sustitución del aminoácido polar negativo ácido glutámico por el aminoácido polar neutro glutamina en el residuo 654 (E654Q Clado 21J, Delta) no inducen cambios en la estructura de la proteína. La sustitución del aminoácido polar



positivo histidina por el aminoácido no polar tirosina en el residuo 655 (H655Y Clado 20J Gamma, V3, 21K, Ómicron) mejora la infectividad en presencia de la mutación N501Y, que se ha reportado que interrumpe la interacción con N657, lo que da como resultado un bucle menos apretado que envuelve el dedo de escisión por la furina (Zhu *et al.*, 2022).

Ahora, la sustitución del aminoácido polar neutro glutamina por el aminoácido polar positivo histidina en el residuo 675 (Q675H Clado 20C) se ubica cerca del sitio de escisión de furina, y confiere ventaja sobre la entrada viral más eficiente ya que contribuye a la formación de una red de enlaces de hidrógeno (Bertelli *et al.*, 2021). La presencia simultánea de Q675H y Q677H en la proteína S confiere una mayor infectividad y transmisibilidad (Rego *et al.*, 2021). Q677G afecta el tropismo celular y la transmisibilidad del virus (Nagy *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido polar neutro treonina por el aminoácido no polar alifático alanina en el residuo 676 (T676A Clado 20B) no muestra modificaciones fenotípicas. La sustitución del aminoácido polar neutro asparagina por el aminoácido polar positivo lisina en el residuo 679 (N679K Clado 21K, Ómicron) se le atribuye el aumento de la escisión mediada por furina (Lubinski *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido prolina por el aminoácido polar positivo histidina en el residuo 681 (P681H Clado 20A, 20B, 20G, 20I Alpha V1, 21K, Ómicron) influye en el sitio de escisión de furina S1/S2 y participa en la modulación de vías de entrada celular (Lista *et al.*, 2022), y la sustitución por el aminoácido polar positivo arginina (P681R Clado 21I, Delta, 21J, Delta) está predominantemente identificada en muestras de la variante delta, incrementa la afinidad por el receptor



ACE2, infectividad y transmisibilidad, facilita la escisión de la proteína espiga y mejora la fusogenicidad viral que se traduce en una mayor patogenicidad (Ginex *et al.*, 2022).

En la Subunidad S2 (Residuo 686-1273) también encontramos una gran cantidad de mutaciones. La sustitución del aminoácido no polar alifático alanina por el aminoácido no polar alifático valina en el residuo 688 (A688V Clado 20A) es la segunda mutación más prevalente del sitio de escisión por furina (Nagy *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido no polar alifático alanina por el aminoácido no polar alifático valina en el residuo en el residuo 701 (A701V Clado 20A, Clado 21K, Ómicron) se relaciona al incremento de la transmisibilidad (Suppiah *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido polar neutro treonina por un aminoácido no polar alifático alanina en el residuo 732 (T732A Clado 20B) se encontró en otras muestras mexicanas (Rodríguez-Maldonado *et al.*, 2021), pero no ha sido asociada con cambios en el fenotipo (Taboada *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido polar neutro serina por el aminoácido no polar alifático alanina en el residuo 735 (S735A Clado 20A) no se ha asociado previamente con cambios en el fenotipo. La sustitución del aminoácido polar neutro asparagina por el aminoácido polar positivo lisina en el residuo 764 (N764K Clado 20A, Clado 21K, Ómicron) afecta la estructura del receptor, altera las interacciones monómero-monómero afectando la dinámica y flexibilidad (Zhao *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido glicina por el aminoácido no polar alifático valina en el residuo 769 (G769V Clado 20A, Clado 20G) cercano al sitio de escisión de furina (Mathema *et al.*, 2022), muestra una baja prevalencia (Alkhatib *et al.*, 2021).



En la región péptido fusión (FP) (Residuos 788-806) se identificó la sustitución del aminoácido polar negativo ácido aspártico por el aminoácido no polar aromático tirosina en el residuo 796 (D796Y Clado 21K, Ómicron), que tiene efecto estabilizador para el trimero de la proteína S al interactuar con los aminoácidos adyacentes (Ni *et al.*, 2021).

En la región de residuos 807 al 911 se encontró la mutación P812L (Clado 20A) ubicada dentro de epítomos inmunitarios específicos, con un rol en la modulación del tropismo y patogenicidad del virus (Magalis *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido no polar alifático alanina por el no polar alifático valina en el residuo 831 (A831V Clado 21K Ómicron) ocurre frecuentemente en combinación con D614G y disminuye la sensibilidad a los anticuerpos (Li *et al.*, 2020). La sustitución del aminoácido polar neutro asparagina por el aminoácido polar positivo lisina en el residuo 856 (N856K Clado 21K Ómicron) genera sitios de escisión potenciales para la serina proteinasa SKI-1/S1p, e impide la exposición del péptido de fusión interno para la fusión de membranas y la formación de sincitios, además se relaciona con el cambio de tropismo del clado Ómicron (Maaroufi, 2022). La sustitución del aminoácido polar neutro treonina por el aminoácido no polar alifático isoleucina (T859I, Clado 20A) o por el aminoácido polar neutro asparagina (T859N Clado 21G, Lambda) en el residuo 859 se acopla con la fenilalanina del residuo 592 pero no se han descrito cambios fenotípicos (Acevedo *et al.*, 2022; Kimura *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar alifático alanina por el no polar alifático valina en el residuo 871 (A871V Clado 20B) ha sido reportada en diferentes genomas; sin embargo, en ninguna referencia la asocian con relevancia (López-Andreo *et al.*, 2023). La sustitución del aminoácido no polar



alifático alanina por el aminoácido polar neutro serina en el residuo 879 (A879S Clado 20G) fue reportado que conduce al reemplazo de hélice con una hoja beta, que participa en la rigidez en la estructura de la proteína, mutación no sinónima significativa reportada en la variante beta (Chand *et al.*, 2020; Umair *et al.*, 2022).

En la secuencia de la heptada repetida 1 (HR1) (residuos 912-984) identificamos 6 sustituciones que pueden contribuir en aumentar la infectividad y mejorar la fusión (Ramirez *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido no polar alifático leucina por el aminoácido no polar aromático fenilalanina en el residuo 922 (L922F Clado 21J, Delta), el cual no ha sido reportado previamente. La sustitución del aminoácido polar negativo ácido aspártico por el aminoácido polar neutro asparagina en el residuo 950 (D950N Clado 21I, Delta, 21J, Delta) es una mutación con alta frecuencia en las variantes Delta; la sustitución del aminoácido polar neutro glutamina por el aminoácido polar positivo histidina en el residuo 954 (Q954H Clado 21K, Ómicron) contribuye en aumentar la infectividad al mejorar la actividad de fusión (Ramirez *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido polar neutro asparagina por el aminoácido polar positivo lisina en el residuo 969 (N969K Clado 21K, Ómicron) induce desplazamiento de la HR2 (K. Yang *et al.*, 2023). La sustitución del aminoácido no polar alifático leucina por el aminoácido no polar aromático fenilalanina en el residuo 981 (L981F Clado 21K, Ómicron) mejora significativamente la fusión del virus con el huésped (Pastorio *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido polar neutro serina por el aminoácido no polar alifático alanina en el residuo 982 (S982A Clado 20I Alpha, V1) muestra una tendencia hacia la actividad de fusión y virulencia, además se reportó que mejora la escisión en



las subunidades S1 y S2 (Ostrov, 2021) y anula un enlace de hidrógeno, lo que facilita el movimiento ascendente de RBD (Gobeil *et al.*, 2021).

En la región que abarca los residuos 985-1162 encontramos la sustitución del aminoácido polar neutro por el aminoácido no polar alifático isoleucina en el residuo 1027 (T1027I Clado 20J Gamma, V3), la cual constituye una de las mutaciones más importantes en la región S2, en la interfaz del dominio de trimerización de la subunidad S2, relacionada con una mayor virulencia y una menor susceptibilidad de la variante Gamma (Asif *et al.*, 2022). La sustitución de aminoácido no polar aromático fenilalanina por el aminoácido no polar aromático tirosina en el residuo 1052 (F1052Y Clado 20J Gamma, V3) y la sustitución del aminoácido polar neutro asparagina por el aminoácido polar neutro serina en el residuo 1074 (N1074S Clado 21I, Delta), no han sido asociadas con modificaciones fenotípicas. La sustitución del aminoácido no polar alifático alanina por un aminoácido polar neutro serina en el residuo 1078 (A1078S Clado 20C) fue encontrada de manera simultánea con las mutaciones A688V y G769V (Tegally *et al.*, 2021). La sustitución del aminoácido no polar alifático valina por el aminoácido no polar alifático leucina en el residuo 1104 (V1104L Clado 21J, Delta) induce interacciones intramoleculares que incrementan la transmisión entre especies (Chand *et al.*, 2020; Yang, 2021).

La sustitución del aminoácido polar negativo ácido aspártico por el aminoácido polar positivo histidina en el residuo 1128 (D1118H Clado 20I Alpha, V1) de la subunidad S2 entre HR1 y HR2, ayuda a estabilizar el trímero de la proteína S a través de interacciones mediadas por moléculas de agua, presente en la variante alfa (Rajah *et*



al., 2021). La sustitución del aminoácido glicina por el aminoácido no polar alifático valina en el residuo 1124 (G1124V Clado 20I Alpha, V1) está incrustado en el dominio conector de la proteína S, el cual es crucial para la trimerización y ayuda a estabilizar la conformación de la proteína durante la fusión con la membrana de la célula huésped (Raheja *et al.*, 2022). La glicina tiene una mayor libertad conformacional que cualquier otro residuo de aminoácido y su sustitución por valina impartiría rigidez a la región local. La posible implicación de tal rigidez en la asociación de la proteína S con la membrana viral podría entenderse a partir de una estructura de la proteína S en asociación con la membrana viral (Maitra *et al.*, 2020), además parece favorecer que el virus escape al reconocimiento inmunitario, ya que esta mutación reduce la afinidad de unión al epítipo de los alelos HLA a un nivel en el que algunos ya no pueden unirse (Guo & Guo, 2020).

La sustitución de ácido aspártico polar negativo por histidina polar positivo en el residuo 1139 (D1139H Clado 20C) en la subunidad 2 relacionado con la fusión del virus. Pero la sustitución del aminoácido no polar alifático fenilalanina por el aminoácido no polar alifático tirosina en el residuo 1052 (F1052Y Clado 20A), la sustitución del aminoácido polar negativo ácido aspártico por el aminoácido no polar aromático tirosina en el residuo 1153 (D1153Y Clado 20J Gamma, V3) y la sustitución del aminoácido prolina por el aminoácido polar neutro serina en el residuo 1162 (P1162S Clado 20A) no tienen efectos atribuidos.

En la región de la heptada repetida 2 (HR2) (residuo1163-1213), se identificaron 4 mutaciones. La sustitución del aminoácido no polar alifático valina por el aminoácido



no polar aromático fenilalanina en el residuo 1176 (V1176F Clado 20J Gamma, V3) favorece la aptitud viral, mejorando la interacción con HR1, lo que podría mejorar el potencial de fusión celular (Yang *et al.*, 2022; Yang, 2021). La sustitución del aminoácido no polar alifático valina por el aminoácido no polar alifático isoleucina en el residuo 1189 (V1189I Clado 20B), la sustitución del aminoácido no polar alifático leucina por el aminoácido no polar alifático valina en el residuo 1200 (L1200V Clado 20B) y la sustitución del aminoácido polar negativo ácido glutámico por el aminoácido polar negativo ácido aspártico en el residuo 1207 (E1207D Clado 20B), no tienen efectos conocidos.

En el dominio MT (Residuos 1213-1237) sólo se identificó la sustitución del aminoácido cisteína por el aminoácido no polar aromático fenilalanina en el residuo 1235 (C1235F Clado 20B) que se ha sugerido que mejora la virulencia (Yang, 2021).

En el dominio citoplasmático (Residuos 1237-1273), la sustitución del aminoácido no polar alifático metionina por el aminoácido no polar alifático isoleucina en el residuo 1237 (M1237I Clado 20A, 20B) se encuentra en la unión entre el dominio transmembranal y el dominio citoplasmático, que en conjunto con la mutación D614G disminuye la sensibilidad y se ha asociado a problemas con diagnóstico y fracaso en el tratamiento (Liu *et al.*, 2022). La sustitución del aminoácido cisteína por el aminoácido no polar aromático fenilalanina (C1253F Clado 21I, Delta), la sustitución del aminoácido polar negativo ácido aspártico por el aminoácido no polar aromático tirosina en el residuo 1260 (D1260Y Clado 20B), la sustitución del aminoácido no polar



alifático valina por el aminoácido no polar alifático leucina (V1264L Clado 21I, Delta) no tienen efectos conocidos.

RELACIÓN DE LAS VARIANTES CIRCULANTES DE SARS-CoV-2 Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Nuestro estudio es el primer trabajo que investiga la relación entre las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con COVID-19 hospitalizados durante el periodo de pandemia 2020-2022 y los clados circulantes de SARS-CoV-2 en el estado de Tabasco.

Entre los factores específicos del huésped destaca la edad y el sexo. Comparamos la edad y el sexo de los pacientes con COVID-19 del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” durante la pandemia 2020-2022 por clado circulante de SARS-CoV-2 y no encontramos diferencia entre ellos.

También analizamos la presentación clínica y la gravedad por clado circulante de SARS-CoV-2. El número de síntomas fue estadísticamente diferente en el clado 20C (8.77 ± 1.0 $p=0.003$) y en el clado 21 (Ómicron) (5.51 ± 0.39 $p = 0.017$) que sugiere que la infección fue diferente del resto de los clados circulantes. Tal como se describió por Menni y colaboradores, los síntomas debilitantes fueron significativamente menores en Ómicron (Menni *et al.*, 2022).

Los valores de laboratorio fueron heterogéneos, pero el número de eritrocitos (3.6 ± 0.1 , $p<0.0001$), hemoglobina (10.5 ± 0.4 , $p<0.0001$), hematocrito (32.2 ± 1.4 , $p<0.0001$), urea (93.2 ± 10.4 , $p=0.000$), BUN (42.7 ± 4.9 , $p=0.001$) fueron estadísticamente diferentes en el clado 20K (Ómicron).



Un estudio de cohorte retrospectivo muestra que la variante Delta se asocia con la severidad de la COVID-19 en Singapur (Ong *et al.*, 2022), contrario con nuestros hallazgos debido a que el mal pronóstico de los pacientes estuvo constante con todos los clados circulantes; sólo el clado 20A fue estadísticamente diferente (defunción 71.8% (n = 28) vs mejoría 28.2% (n = 11) $p=0.028$). Otros estudios han reportado que la proporción de afección respiratoria aguda fue menor 31.6%, y la tasa de mortalidad fue del 2.7% en pacientes del clado Ómicron (Maslo *et al.*, 2022). Una posible explicación para estas observaciones contradictorias puede ser que el Clado 20A se presentó durante la primera ola de COVID-19 en México, periodo donde el desconocimiento de la enfermedad, la automedicación, la saturación y el retraso en la atención hospitalaria pudieron tener un papel clave en el desenlace.



CONCLUSIONES

1. El grupo de pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús” durante la pandemia 2020-2022, se caracterizó por estar integrado por una mayor cantidad de hombres adultos, de la séptima década de la vida, residentes de la capital del estado de Tabasco. Con respecto a las características clínicas, fiebre, tos, cefalea y disnea estuvieron presentes en dos terceras partes de la población estudiada. Las principales enfermedades coexistentes fueron diabetes, hipertensión y obesidad. La media de estancia intrahospitalaria fue de 5 días y más del 50% de la población incluida murió. Además, destaca la utilidad de las pruebas de laboratorio en el manejo de la enfermedad.
2. Los datos sugieren que durante el periodo de la pandemia 2020-2022, circularon 11 clados de SARS-CoV-2 en pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”. El examen a profundidad de la epidemiología genómica indica que tuvieron por lo menos una mutación en la proteína S. La mutación D614G fue la más frecuente, y confirmamos que el clado 21K Ómicron es el que posee la mayor cantidad de mutaciones. Las sustituciones de aminoácidos en la región N-terminal y del dominio de unión con el receptor ACE2 son altamente frecuentes.
3. Con respecto a la relación de las variantes del virus con las características clínicas y desenlace del COVID-19, se concluye que la cantidad de síntomas por clado no



es uniforme, y en la población estudiada los que fueron infectados por virus del clado 20C y 21K Ómicron tuvieron una presentación clínica diferente. Los pacientes del clado 20C tuvieron una mayor cantidad de síntomas y los del clado 21K Ómicron reportaron una cantidad menor de síntomas. Mientras tanto, la mortalidad para los pacientes del clado 20A, el primer clado circulante de SARS-CoV-2 fue estadísticamente diferente al de los otros clados, y se asoció con la mortalidad de los pacientes comparada con los otros clados que circularon durante la pandemia 2020-2022 en pacientes hospitalizados en Tabasco.



PERSPECTIVAS

Después de vivir una de las peores emergencias médicas de nuestra época es indispensable mantener la vigilancia epidemiológica de SARS-CoV-2 para identificar las variaciones y contribuir en minimizar el impacto en la transmisión, virulencia y patogenicidad del virus.

También resulta útil estudiar las características del receptor ACE2 humano para identificar si existen variaciones que intervienen en la afinidad de la unión o resistencia al virus.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, M. L., Gaete-Argel, A., Alonso-Palomares, L., de Oca, M. M., Bustamante, A., Gaggero, A., Soto-Rifo, R. (2022). Differential neutralizing antibody responses elicited by CoronaVac and BNT162b2 against SARS-CoV-2 Lambda in Chile. *Nature Microbiology*, 7(4), 524-529. doi:10.1038/s41564-022-01092-1
- Ai, T., Yang, Z., Hou, H., Zhan, C., Chen, C., Lv, W., . . . Xia, L. (2020). Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology*, 296(2), E32-E40. doi:10.1148/radiol.2020200642
- Al-Khatib, H. A., Smatti, M. K., Ali, F. H., Zedan, H. T., Thomas, S., Ahmed, M. N., Coyle, P. V. (2022). Comparative analysis of within-host diversity among vaccinated COVID-19 patients infected with different SARS-CoV-2 variants. *Iscience*, 25(11), 105438.
- Aleem, A., AB, A. S., & Slenker, A. K. (2021). Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19).
- Alkhatib, M., Svicher, V., Salpini, R., Ambrosio, F. A., Bellocchi, M. C., Carioti, L., Artese, A. (2021). SARS-CoV-2 variants and their relevant mutational profiles: update summer 2021. *Microbiol Spectr*, 9(3), e01096-01021.
- Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S. C., Das, A., Kumar, M. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of molecular biology*, 433(2), 166725. doi:https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024
- Asif, A., Ilyas, I., Abdullah, M., Sarfraz, S., Mustafa, M., & Mahmood, A. (2022). The Comparison of Mutational Progression in SARS-CoV-2: A Short Updated Overview. *Journal of Molecular Pathology*, 3(4), 201-218.
- Bertelli, A., D'Ursi, P., Campisi, G., Messali, S., Milanese, M., Giovanetti, M., Caruso, A. (2021). Role of Q675H mutation in improving SARS-CoV-2 spike interaction with the furin binding pocket. *Viruses*, 13(12), 2511.
- Bui, N.-N., Lin, Y.-T., Huang, S.-H., & Lin, C.-W. (2021). The extent of molecular variation in novel SARS-CoV-2 after the six-month global spread. *Infection, Genetics and Evolution*, 91, 104800. doi:https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104800
- Cao, Y., Wang, J., Jian, F., Xiao, T., Song, W., Yisimayi, A., An, R. (2022). Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature*, 602(7898), 657-663.
- CDC. (2021). SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions
Disponibile en <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html>.
- Chakraborty, S., Saha, A., Saha, C., Ghosh, S., & Mondal, T. (2022). Decoding the effects of spike receptor binding domain mutations on antibody escape abilities of omicron variants. *Biochem Biophys Res Commun*, 627, 168-175. doi:10.1016/j.bbrc.2022.08.050
- Chand, G. B., Banerjee, A., & Azad, G. K. (2020). Identification of twenty-five mutations in surface glycoprotein (Spike) of SARS-CoV-2 among Indian isolates and their



- impact on protein dynamics. *Gene Reports*, 21, 100891. doi:<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100891>
- Chen, X., Kang, Y., Luo, J., Pang, K., Xu, X., Wu, J., Jin, S. (2021). Next-Generation Sequencing Reveals the Progression of COVID-19. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 632490-632490. doi:10.3389/fcimb.2021.632490
- Choi, J. Y., & Smith, D. M. (2021). SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei medical journal*, 62(11), 961-968. doi:10.3349/ymj.2021.62.11.961
- D'Agostino, Y., Rocco, T., Ferravante, C., Porta, A., Tosco, A., Cappa, V. M., Rizzo, F. (2022). Rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 variants in nasopharyngeal swabs and wastewaters. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 102(4), 115632-115632. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2021.115632
- Daniels, R. S., Harvey, R., Ermetal, B., Xiang, Z., Galiano, M., Adams, L., & McCauley, J. W. (2021). A Sanger sequencing protocol for SARS-CoV-2 S-gene. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 15(6), 707-710. doi:<https://doi.org/10.1111/irv.12892>
- Davies, N. G., Jarvis, C. I., van Zandvoort, K., Clifford, S., Sun, F. Y., Funk, S., Group, C. C.-W. (2021). Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. *Nature*, 593(7858), 270-274. doi:10.1038/s41586-021-03426-1
- De Marco, C., Veneziano, C., Massacci, A., Pallocca, M., Marascio, N., Quirino, A., Lamberti, A. G. (2022). Dynamics of viral infection and evolution of SARS-CoV-2 variants in the Calabria area of Southern Italy. *Frontiers in Microbiology*, 13.
- Di Giacomo, S., Mercatelli, D., Rakhimov, A., & Giorgi, F. M. (2021). Preliminary report on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike mutation T478K. *Journal of medical virology*, 93(9), 5638-5643.
- DOF. (1987). Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud.
- Dorlass, E. G., Lourenço, K. L., Magalhães, R. D. M., Sato, H., Fiorini, A., Peixoto, R., Teixeira, S. M. R. (2021). Survey of SARS-CoV-2 genetic diversity in two major Brazilian cities using a fast and affordable Sanger sequencing strategy. *Genomics*, 113(6), 4109-4115. doi:10.1016/j.ygeno.2021.10.015
- Dubey, A., Choudhary, S., Kumar, P., & Tomar, S. (2021). Emerging SARS-CoV-2 Variants: Genetic Variability and Clinical Implications. *Current Microbiology*, 79(1), 20. doi:10.1007/s00284-021-02724-1
- Dudas, G., Hong, S. L., Potter, B. I., Calvignac-Spencer, S., Niatou-Singa, F. S., Tombolomako, T. B., Baele, G. (2021). Emergence and spread of SARS-CoV-2 lineage B.1.620 with variant of concern-like mutations and deletions. *Nat Commun*, 12(1), 5769. doi:10.1038/s41467-021-26055-8
- El Mazouri, S., Bendani, H., Boumajdi, N., Aanniz, T., Kandoussi, I., Amzazi, S., Ouadghiri, M. (2022). Phylogeography and genomic analysis of SARS-CoV-2 delta variant in Morocco. *J Infect Dev Ctries*, 16(8), 1258-1268. doi:10.3855/jidc.16513
- Elrashdy, F., Redwan, E. M., & Uversky, V. N. (2020). Why COVID-19 Transmission Is More Efficient and Aggressive Than Viral Transmission in Previous Coronavirus Epidemics? *Biomolecules*, 10(9), 1312. doi:10.3390/biom10091312



- Franco-Muñoz, C., Álvarez-Díaz, D. A., Laiton-Donato, K., Wiesner, M., Escandón, P., Usme-Ciro, J. A., Mercado-Reyes, M. (2020). Substitutions in Spike and Nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 circulating in South America. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 85, 104557-104557. doi:10.1016/j.meegid.2020.104557
- Gálvez, J. M., Chaparro-Solano, H. M., Pinzón-Rondón Á, M., Albornoz, L. L., Pardo-Oviedo, J. M., Zapata-Gómez, F. A., Ruiz-Sternberg Á, M. (2022). Mutation profile of SARS-CoV-2 genome in a sample from the first year of the pandemic in Colombia. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 97, 105192. doi:10.1016/j.meegid.2021.105192
- Ghanchi, N. K., Nasir, A., Masood, K. I., Abidi, S. H., Mahmood, S. F., Kanji, A., Yameen, M. (2021). Higher entropy observed in SARS-CoV-2 genomes from the first COVID-19 wave in Pakistan. *PloS one*, 16(8), e0256451.
- Ginex, T., Marco-Marín, C., Wiecezór, M., Mata, C. P., Krieger, J., Ruiz-Rodriguez, P., . . . Sánchez-Sorzano, C. Ó. (2022). The structural role of SARS-CoV-2 genetic background in the emergence and success of spike mutations: The case of the spike A222V mutation. *PLoS Pathogens*, 18(7), e1010631.
- Gobeil, S. M.-C., Janowska, K., McDowell, S., Mansouri, K., Parks, R., Stalls, V., . . . Wiehe, K. (2021). Effect of natural mutations of SARS-CoV-2 on spike structure, conformation, and antigenicity. *Science*, 373(6555), eabi6226.
- González-Candelas, F., Shaw, M.-A., Phan, T., Kulkarni-Kale, U., Paraskevis, D., Luciani, F., . . . Sironi, M. (2021). One year into the pandemic: Short-term evolution of SARS-CoV-2 and emergence of new lineages. *Infection, Genetics and Evolution*, 92, 104869. doi:https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104869
- Grabowski, F., Kochańczyk, M., & Lipniacki, T. (2021). L18F substrain of SARS-CoV-2 VOC-202012/01 is rapidly spreading in England. *MedRxiv*, 2021.2002.2007.21251262.
- Gralinski, L. E., & Menachery, V. D. (2020). Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, 12(2), 135. doi:10.3390/v12020135
- Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X., Zhong, N. S. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*, 382(18), 1708-1720. doi:10.1056/NEJMoa2002032
- Guo, E., & Guo, H. (2020). CD8 T cell epitope generation toward the continually mutating SARS-CoV-2 spike protein in genetically diverse human population: Implications for disease control and prevention. *PloS one*, 15(12), e0239566.
- Guo, Y.-R., Cao, Q.-D., Hong, Z.-S., Tan, Y.-Y., Chen, S.-D., Jin, H.-J., Yan, Y. (2020). The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Military Medical Research*, 7(1), 11. doi:10.1186/s40779-020-00240-0
- Gupta, D., Sharma, P., Singh, M., Kumar, M., Ethayathulla, A. S., & Kaur, P. (2021). Structural and functional insights into the spike protein mutations of emerging SARS-CoV-2 variants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(24), 7967-7989. doi:10.1007/s00018-021-04008-0



- Hanifa, M., Muhammad, S., Fatima, M., Mukhtar, N., Almajhdi, D., Nasser, F., . . . Waheed, Y. (2022). Mutational Analysis of the Spike Protein of SARs-COV-2 revealed atomistic features responsible for higher binding and Infectivity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 2516.
- Hasöksüz, M., Kiliç, S., & Saraç, F. (2020). Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turkish journal of medical sciences*, 50(SI-1), 549-556. doi:10.3906/sag-2004-127
- Hofman, P., Bordone, O., Chamorey, E., Benzaquen, J., Schiappa, R., Lespinet-Fabre, V., . . . Ilié, M. (2021). Setting-Up a Rapid SARS-CoV-2 Genome Assessment by Next-Generation Sequencing in an Academic Hospital Center (LPCE, Louis Pasteur Hospital, Nice, France). *Front Med (Lausanne)*, 8, 730577. doi:10.3389/fmed.2021.730577
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395(10223), 497-506. doi:10.1016/s0140-6736(20)30183-5
- Huang, S., Wang, J., Liu, F., Liu, J., Cao, G., Yang, C., Xiong, B. (2020). COVID-19 patients with hypertension have more severe disease: a multicenter retrospective observational study. *Hypertension Research*, 43(8), 824-831. doi:10.1038/s41440-020-0485-2
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X.-f., Xu, W., & Liu, S.-w. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9), 1141-1149. doi:10.1038/s41401-020-0485-4
- Jackson, B., Boni, M. F., Bull, M. J., Collieran, A., Colquhoun, R. M., Darby, A. C., . . . McCrone, J. T. (2021). Generation and transmission of interlineage recombinants in the SARS-CoV-2 pandemic. *Cell*, 184(20), 5179-5188. e5178.
- Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A., & Barvkar, V. T. (2021). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of basic microbiology*, 61(3), 180-202. doi:10.1002/jobm.202000537
- Kimura, I., Kosugi, Y., Wu, J., Zahradnik, J., Yamasoba, D., Butlertanaka, E. P., . . . Sato, K. (2022). The SARS-CoV-2 Lambda variant exhibits enhanced infectivity and immune resistance. *Cell Reports*, 38(2), 110218. doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110218
- Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 85, 104502-104502. doi:10.1016/j.meegid.2020.104502
- Klinakis, A., Cournia, Z., & Rampias, T. (2021). N-terminal domain mutations of the spike protein are structurally implicated in epitope recognition in emerging SARS-CoV-2 strains. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 5556-5567.
- Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., . . . Foley, B. (2020). Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell*, 182(4), 812-827. e819.



- Koyama, T., Miyakawa, K., Tokumasu, R., S Jeremiah, S., Kudo, M., & Ryo, A. (2022). Evasion of vaccine-induced humoral immunity by emerging sub-variants of SARS-CoV-2. *Future Microbiology*, 17(6), 417-424.
- Kullappan, M., Mary, U., Ambrose, J. M., Veeraraghavan, V. P., & Surapaneni, K. M. (2021). Elucidating the role of N440K mutation in SARS-CoV-2 spike-ACE-2 binding affinity and COVID-19 severity by virtual screening, molecular docking and dynamics approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-18.
- Kuzmina, A., Khalaila, Y., Voloshin, O., Keren-Naus, A., Boehm-Cohen, L., Raviv, Y., . . . Taube, R. (2021). SARS-CoV-2 spike variants exhibit differential infectivity and neutralization resistance to convalescent or post-vaccination sera. *Cell host & microbe*, 29(4), 522-528.e522. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.008>
- Lauring, A. S., & Hodcroft, E. B. (2021). Genetic Variants of SARS-CoV-2—What Do They Mean? *JAMA*, 325(6), 529-531. doi:10.1001/jama.2020.27124
- Li, F. (2016). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual review of virology*, 3(1), 237-261. doi:10.1146/annurev-virology-110615-042301
- Li, Q., Wu, J., Nie, J., Zhang, L., Hao, H., Liu, S., . . . Wang, Y. (2020). The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. *Cell*, 182(5), 1284-1294.e1289. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.012>
- Liang, R., Ye, Z. W., Ong, C. P., Qin, Z., Xie, Y., Fan, Y., . . . Yuan, S. (2022). The spike receptor-binding motif G496S substitution determines the replication fitness of SARS-CoV-2 Omicron sublineage. *Emerg Microbes Infect*, 11(1), 2093-2101. doi:10.1080/22221751.2022.2111977
- Lista, M. J., Winstone, H., Wilson, H. D., Dyer, A., Pickering, S., Galao, R. P., Suarez, N. (2022). The P681H Mutation in the Spike Glycoprotein of the Alpha Variant of SARS-CoV-2 Escapes IFITM Restriction and Is Necessary for Type I Interferon Resistance. *J Virol*, 96(23), e01250-01222.
- Liu, L.-T., Tsai, J.-J., Chang, K., Chen, C.-H., Lin, P.-C., Tsai, C.-Y., Chang, J.-M. (2022). Identification and analysis of SARS-CoV-2 alpha variants in the largest Taiwan COVID-19 outbreak in 2021. *Front Med (Lausanne)*, 9.
- Liu, L., Iketani, S., Guo, Y., Chan, J. F., Wang, M., Liu, L., . . . Ho, D. D. (2022). Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature*, 602(7898), 676-681. doi:10.1038/s41586-021-04388-0
- López-Andreo, M. J., Vicente-Romero, M. R., Bernal, E., Navarro-González, I., Salazar-Martínez, F., Cánovas-Cánovas, V., Ibáñez-López, F. J. J. D. (2023). Whole Sequencing and Detailed Analysis of SARS-CoV-2 Genomes in Southeast Spain: Identification of Recurrent Mutations in the 20E (EU1) Variant with Some Clinical Implications. 11(2), 54.
- Lourenco, J., Paton, R., Thompson, C., Klenerman, P., & Gupta, S. (2020). Fundamental principles of epidemic spread highlight the immediate need for large-scale serological surveys to assess the stage of the SARS-CoV-2 epidemic. *MedRxiv*.
- Lu, H., Stratton, C. W., & Tang, Y. W. (2020). Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *Journal of medical virology*, 92(4), 401.



- Lubinski, B., Jaimes, J. A., & Whittaker, G. R. (2022). Intrinsic furin-mediated cleavability of the spike S1/S2 site from SARS-CoV-2 variant B. 1.1. 529 (Omicron). *BioRxiv*, 2022.2004. 2020.488969.
- Maaroufi, H. J. B. (2022). The N764K and N856K mutations in SARS-CoV-2 Omicron BA. 1 S protein generate potential cleavage sites for SKI-1/S1P protease. 2022.2001. 2021.477298.
- Magalis, B. R., Mavian, C., Tagliamonte, M., Rich, S. N., Cash, M., Riva, A., . . . Zhang, Y. (2022). Low-frequency variants in mildly symptomatic vaccine breakthrough infections presents a doubled-edged sword. *Journal of medical virology*, 94(7), 3192-3202.
- Mahmood, T. B., Hossan, M. I., Mahmud, S., Shimu, M. S. S., Alam, M. J., Bhuyan, M. M. R., & Emran, T. B. (2022). Missense mutations in spike protein of SARS-CoV-2 delta variant contribute to the alteration in viral structure and interaction with hACE2 receptor. *Immunity, inflammation and disease*, 10(9), e683.
- Mahtarin, R., Islam, S., Islam, M. J., Ullah, M. O., Ali, M. A., & Halim, M. A. (2022). Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2. *J Biomol Struct Dyn*, 40(10), 4725-4738. doi:10.1080/07391102.2020.1861983
- Maitra, A., Sarkar, M. C., Raheja, H., Biswas, N. K., Chakraborti, S., Singh, A. K., . . . Mondal, R. K. (2020). Mutations in SARS-CoV-2 viral RNA identified in Eastern India: Possible implications for the ongoing outbreak in India and impact on viral structure and host susceptibility. *Journal of Biosciences*, 45, 1-18.
- Malik, Y. A. (2020). Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol*, 42(1), 3-11.
- Mannar, D., Saville, J. W., Sun, Z., Zhu, X., Marti, M. M., Srivastava, S. S., . . . Subramaniam, S. (2022). SARS-CoV-2 variants of concern: spike protein mutational analysis and epitope for broad neutralization. *Nat Commun*, 13(1), 4696. doi:10.1038/s41467-022-32262-8
- Maslo, C., Friedland, R., Toubkin, M., Laubscher, A., Akaloo, T., & Kama, B. (2022). Characteristics and outcomes of hospitalized patients in South Africa during the COVID-19 Omicron wave compared with previous waves. *JAMA*, 327(6), 583-584.
- Massi, M. N., Sjahril, R., Halik, H., Soraya, G. V., Hidayah, N., Pratama, M. Y., . . . Hakim, M. S. (2023). Sequence analysis of SARS-CoV-2 Delta variant isolated from Makassar, South Sulawesi, Indonesia. *Heliyon*.
- Mathema, B., Chen, L., Wang, P., Cunningham, M. H., Mediavilla, J. R., Chow, K. F., . . . Zuckerman, J. (2022). Genomic Epidemiology and Serology Associated with a SARS-CoV-2 R. 1 Variant Outbreak in New Jersey. *Mbio*, 13(5), e02141-02122.
- Matthijs, G., Souche, E., Alders, M., Corveleyn, A., Eck, S., Feenstra, J., . . . European Society of Human, G. (2016). Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *European journal of human genetics : EJHG*, 24(1), 2-5. doi:10.1038/ejhg.2015.226
- McAdam, A. J. (2022). Cycle Threshold Values from Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assays: Interpretation and Potential Use Cases. *Clinics in Laboratory Medicine*, 42(2), 237-248. doi:https://doi.org/10.1016/j.cll.2022.02.003



- Menni, C., Valdes, A. M., Polidori, L., Antonelli, M., Penamakuri, S., Nogal, A., . . . Spector, T. D. (2022). Symptom prevalence, duration, and risk of hospital admission in individuals infected with SARS-CoV-2 during periods of omicron and delta variant dominance: a prospective observational study from the ZOE COVID Study. *Lancet*, 399(10335), 1618-1624. doi:10.1016/s0140-6736(22)00327-0
- Mistry, P., Barmania, F., Mellet, J., Peta, K., Strydom, A., Viljoen, I. M., . . . Pepper, M. S. (2021). SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol*, 12, 809244. doi:10.3389/fimmu.2021.809244
- Moghaddar, M., Radman, R., & Macreadie, I. (2021). Severity, pathogenicity and transmissibility of delta and lambda variants of SARS-CoV-2, toxicity of spike protein and possibilities for future prevention of COVID-19. *Microorganisms*, 9(10), 2167.
- Mohammadi, M., Shayestehpour, M., & Mirzaei, H. (2021). The impact of spike mutated variants of SARS-CoV2 [Alpha, Beta, Gamma, Delta, and Lambda] on the efficacy of subunit recombinant vaccines. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 25(4), 101606-101606. doi:10.1016/j.bjid.2021.101606
- Mondeali, M., Etemadi, A., Barkhordari, K., Mobini Kesheh, M., Shavandi, S., Bahavar, A., . . . Modarressi, M. H. (2023). The role of S477N mutation in the molecular behavior of SARS-CoV-2 spike protein: An in-silico perspective. *Journal of Cellular Biochemistry*.
- Motozono, C., Toyoda, M., Tan, T. S., Hamana, H., Aritsu, Y., Miyashita, Y., . . . Udaka, K. (2022). The SARS-CoV-2 Omicron BA. 1 spike G446S potentiates HLA-A* 24: 02-restricted T cell immunity. *BioRxiv*, 2022.2004. 2017.488095.
- Nagy, A., Basiouni, S., Parvin, R., Hafez, H. M., & Shehata, A. A. (2021). Evolutionary insights into the furin cleavage sites of SARS-CoV-2 variants from humans and animals. *Archives of virology*, 166, 2541-2549.
- Nasir, A., Bukhari, A. R., Trovão, N. S., Thielen, P. M., Kanji, A., Mahmood, S. F., . . . Mehoke, T. (2022). Evolutionary history and introduction of SARS-CoV-2 Alpha VOC/B. 1.1. 7 in Pakistan through international travelers. *Virus Evol*, 8(1), veac020.
- 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*, 2021.2001. 2013.426558.
- Ngoi, J. M., Quashie, P. K., Morang'a, C. M., Bonney, J. H., Amuzu, D. S., Kumordjie, S., . . . Boatemaa, L. (2021). Genomic analysis of SARS-CoV-2 reveals local viral evolution in Ghana. *Experimental Biology and Medicine*, 246(8), 960-970.
- Ni, D., Lau, K., Turelli, P., Raclot, C., Beckert, B., Nazarov, S., . . . Trono, D. J. B. (2021). Structural analysis of the Spike of the Omicron SARS-COV-2 variant by cryo-EM and implications for immune evasion. 2021.2012. 2027.474250.
- Nyberg, T., Twohig, K. A., Harris, R. J., Seaman, S. R., Flannagan, J., Allen, H., . . . Presanis, A. M. (2021). Risk of hospital admission for patients with SARS-CoV-



- 2 variant B.1.1.7: cohort analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 373, n1412-n1412. doi:10.1136/bmj.n1412
- O'Leary, V. B., Dolly, O. J., Höschl, C., Černa, M., & Ovsepián, S. V. (2020). Unpacking Pandora From Its Box: Deciphering the Molecular Basis of the SARS-CoV-2 Coronavirus. *International journal of molecular sciences*, 22(1). doi:10.3390/ijms22010386
- Ong, S. W. X., Chiew, C. J., Ang, L. W., Mak, T. M., Cui, L., Toh, M., . . . Young, B. E. (2022). Clinical and Virological Features of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Variants of Concern: A Retrospective Cohort Study Comparing B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), and B.1.617.2 (Delta). *Clin Infect Dis*, 75(1), e1128-e1136. doi:10.1093/cid/ciab721
- Ostrov, D. A. (2021). Structural consequences of variation in SARS-CoV-2 B. 1.1. 7. *Journal of cellular immunology*, 3(2), 103.
- Pachetti, M., Marini, B., Benedetti, F., Giudici, F., Mauro, E., Storici, P., . . . Gallo, R. C. (2020). Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *Journal of translational medicine*, 18(1), 1-9.
- Papoutsis, A., Borody, T., Dolai, S., Daniels, J., Steinberg, S., Barrows, B., & Hazan, S. (2021). Detection of SARS-CoV-2 from patient fecal samples by whole genome sequencing. *Gut pathogens*, 13(1), 7-7. doi:10.1186/s13099-021-00398-5
- Pastorio, C., Zech, F., Noettger, S., Jung, C., Jacob, T., Sanderson, T., . . . Kirchhoff, F. (2022). Determinants of Spike infectivity, processing, and neutralization in SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.1 and BA.2. *Cell host & microbe*, 30(9), 1255-1268.e1255. doi:https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.07.006
- Peter, J. H., Nicholas, R. M., Luis, A. H., III, Robert, M., Gage, K. M., Katarina, M. B., . . . David, H. O. C. (2022). Evolution of a globally unique SARS-CoV-2 Spike E484T monoclonal antibody escape mutation in a persistently infected, immunocompromised individual. *MedRxiv*, 2022.2004.2011.22272784. doi:10.1101/2022.04.11.22272784
- Prasetyoputri, A., Dharmayanthi, A. B., Iryanto, S. B., Andriani, A., Nuryana, I., Wardiana, A., . . . Nugroho, H. A. (2022). The dynamics of circulating SARS-CoV-2 lineages in Bogor and surrounding areas reflect variant shifting during the first and second waves of COVID-19 in Indonesia. *PeerJ*, 10, e13132.
- Raheja, H., Das, S., Banerjee, A., Mukhopadhyay, D., Ramachandra, S. G., & Das, S. (2022). RG203KR Mutations in SARS-CoV-2 Nucleocapsid: Assessing the Impact Using a Virus-Like Particle Model System. *Microbiol Spectr*, 10(4), e00781-00722.
- Rajah, M. M., Hubert, M., Bishop, E., Saunders, N., Robinot, R., Grzelak, L., . . . Schwartz, O. (2021). SARS-CoV-2 Alpha, Beta, and Delta variants display enhanced Spike-mediated syncytia formation. *The EMBO Journal*, 40(24), e108944. doi:https://doi.org/10.15252/emboj.2021108944
- Ramirez, S., Fernandez-Antunez, C., Galli, A., Underwood, A., Pham, L. V., Ryberg, L. A., . . . Bukh, J. (2021). Overcoming Culture Restriction for SARS-CoV-2 in Human Cells Facilitates the Screening of Compounds Inhibiting Viral Replication. 65(7), 10.1128/aac.00097-00021. doi:doi:10.1128/aac.00097-21



- Ray, D., Le, L., & Andricioaei, I. (2021). Distant residues modulate conformational opening in SARS-CoV-2 spike protein. *118(43)*, e2100943118. doi:doi:10.1073/pnas.2100943118
- Rego, N., Salazar, C., Paz, M., Costábile, A., Fajardo, A., Ferrés, I., . . . Machado, M. R. (2021). Emergence and spread of a B. 1.1. 28-derived P. 6 lineage with Q675H and Q677H spike mutations in Uruguay. *Viruses*, *13(9)*, 1801.
- Rodríguez-Maldonado, A. P., Vázquez-Pérez, J. A., Cedro-Tanda, A., Taboada, B., Boukadida, C., Wong-Arámbula, C., . . . Hernández-Rivas, L. (2021). Emergence and spread of the potential variant of interest (VOI) B. 1.1. 519 of SARS-CoV-2 predominantly present in Mexico. *Archives of virology*, *166(11)*, 3173-3177.
- Safiabadi Tali, S. H., LeBlanc, J. J., Sadiq, Z., Oyewunmi, O. D., Camargo, C., Nikpour, B., . . . Jahanshahi-Anbuhi, S. (2021). Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clin Microbiol Rev*, *34(3)*. doi:10.1128/cmr.00228-20
- Saha, I., Ghosh, N., Sharma, N., & Nandi, S. (2021). Hotspot mutations in SARS-CoV-2. *Frontiers in Genetics*, *12*, 753440.
- Sahajpal, N. S., Mondal, A. K., Njau, A., Petty, Z., Chen, J., Ananth, S., . . . Kolhe, R. (2021). High-Throughput Next-Generation Sequencing Respiratory Viral Panel: A Diagnostic and Epidemiologic Tool for SARS-CoV-2 and Other Viruses. *Viruses*, *13(10)*, 2063. doi:10.3390/v13102063
- Saikatendu, K. S., Joseph, J. S., Subramanian, V., Neuman, B. W., Buchmeier, M. J., Stevens, R. C., & Kuhn, P. (2007). Ribonucleocapsid formation of severe acute respiratory syndrome coronavirus through molecular action of the N-terminal domain of N protein. *J Virol*, *81(8)*, 3913-3921. doi:10.1128/jvi.02236-06
- Saito, A., Irie, T., Suzuki, R., Maemura, T., Nasser, H., Uriu, K., . . . Kimura, I. (2022). Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature*, *602(7896)*, 300-306.
- Salehi-Vaziri, M., Fazlalipour, M., Seyed Khorrami, S. M., Azadmanesh, K., Pouriayevali, M. H., Jalali, T., . . . Maleki, A. (2022). The ins and outs of SARS-CoV-2 variants of concern (VOCs). *167(2)*, 327-344. doi:10.1007/s00705-022-05365-2
- Salleh, M. Z., Derrick, J. P., & Deris, Z. Z. (2021). Structural evaluation of the spike glycoprotein variants on SARS-CoV-2 transmission and immune evasion. *International journal of molecular sciences*, *22(14)*, 7425.
- Satarker, S., & Nampoothiri, M. (2020). Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Archives of Medical Research*, *51(6)*, 482-491. doi:https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.05.012
- Shaibu, J. O., Onwuamah, C. K., James, A. B., Okwuraiwe, A. P., Amoo, O. S., Salu, O. B., . . . Audu, R. A. (2021). Full length genomic sanger sequencing and phylogenetic analysis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Nigeria. *PloS one*, *16(1)*, e0243271-e0243271. doi:10.1371/journal.pone.0243271
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117(21)*, 11727-11734.



- Shen, L., Triche, T. J., Bard, J. D., Biegel, J. A., Judkins, A. R., & Gai, X. (2021). Spike Protein NTD mutation G142D in SARS-CoV-2 Delta VOC lineages is associated with frequent back mutations, increased viral loads, and immune evasion. *MedRxiv*, 2021.2009.2012.21263475.
- Shenoy, M. T., Mohanty, P. K., Suganthi, K., Manavalan, J. K., & Alexander, H. (2022). Utility of Biochemical Markers in Predicting Severe COVID-19: Experience from a Tertiary Hospital in South India. *Ejifcc*, 33(2), 131-144.
- Singh, P., Sharma, K., Singh, P., Bhargava, A., Negi, S. S., Sharma, P., . . . Nagarkar, N. M. (2022). Genomic characterization unravelling the causative role of SARS-CoV-2 Delta variant of lineage B. 1.617. 2 in 2nd wave of COVID-19 pandemic in Chhattisgarh, India. *Microbial Pathogenesis*, 164, 105404.
- Sixto-López, Y., Correa-Basurto, J., Bello, M., Landeros-Rivera, B., Garzón-Tiznado, J. A., & Montaña, S. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 spike protein and its natural mutants found in Mexican population. *Scientific reports*, 11(1), 4659. doi:10.1038/s41598-021-84053-8
- Stegeman, I., Ochodo, E. A., Guleid, F., Holtman, G. A., Yang, B., Davenport, C., . . . Leeflang, M. M. (2020). Routine laboratory testing to determine if a patient has COVID-19. *Cochrane Database Syst Rev*, 11(11), Cd013787. doi:10.1002/14651858.cd013787
- Struyf, T., Deeks, J. J., Dinnes, J., Takwoingi, Y., Davenport, C., Leeflang, M. M., . . . Van den Bruel, A. (2020). Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19 disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 7(7), Cd013665. doi:10.1002/14651858.cd013665
- Suárez, V., Suarez Quezada, M., Oros Ruiz, S., & Ronquillo De Jesús, E. (2020). Epidemiología de COVID-19 en México: del 27 de febrero al 30 de abril de 2020. *Revista Clínica Española*, 220(8), 463-471. doi:10.1016/j.rce.2020.05.007
- Sun, C., Xie, C., Bu, G. L., Zhong, L. Y., & Zeng, M. S. (2022). Molecular characteristics, immune evasion, and impact of SARS-CoV-2 variants. *Signal Transduct Target Ther*, 7(1), 202. doi:10.1038/s41392-022-01039-2
- Suppiah, J., Kamel, K., Mohd-Zawawi, Z., Afizan, M., Yahya, H., Md-Hanif, S., & Thayan, R. (2021). SHORT COMMUNICATION Phylogenomic analysis of SARS-CoV-2 from third wave clusters in Malaysia reveals dominant local lineage B. 1.524 and persistent spike mutation A701V. *Tropical biomedicine*, 38(3), 289-293.
- Taboada, B., Zárate, S., García-López, R., Muñoz-Medina, J. E., Sanchez-Flores, A., Herrera-Estrella, A., . . . Rosales-Rivera, M. (2022). Dominance of three sublineages of the SARS-CoV-2 Delta variant in Mexico. *Viruses*, 14(6), 1165.
- Taboada, B., Zárate, S., Iña, P., Boukadida, C., Vazquez-Perez, J. A., Muñoz-Medina, J. E., . . . Rincón-Rubio, A. (2021). Genetic analysis of SARS-CoV-2 variants in Mexico during the first year of the COVID-19 pandemic. *Viruses*, 13(11), 2161.
- Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., . . . de Oliveira, T. (2021). Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*, 592(7854), 438-443. doi:10.1038/s41586-021-03402-9



- Tegally, H., Wilkinson, E., Lessells, R. J., Giandhari, J., Pillay, S., Msomi, N., . . . Walaza, S. (2021). Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa. *Nature medicine*, 27(3), 440-446.
- Tian, F., Tong, B., Sun, L., Shi, S., Zheng, B., Wang, Z., . . . Zheng, P. (2021). Mutation N501Y in RBD of Spike Protein Strengthens the Interaction between COVID-19 and its Receptor ACE2. *BioRxiv*, 2021.2002. 2014.431117.
- Umair, M., Ikram, A., Salman, M., Haider, S. A., Badar, N., Rehman, Z., . . . Ali, Q. (2022). Genomic surveillance reveals the detection of SARS-CoV-2 delta, beta, and gamma VOCs during the third wave in Pakistan. *Journal of medical virology*, 94(3), 1115-1129.
- van Dorp, L., Acman, M., Richard, D., Shaw, L. P., Ford, C. E., Ormond, L., . . . Balloux, F. (2020). Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 83, 104351. doi:10.1016/j.meegid.2020.104351
- Wang, C., Liu, Z., Chen, Z., Huang, X., Xu, M., He, T., & Zhang, Z. (2020). The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. *Journal of medical virology*, 92(6), 667-674.
- Wang, H., Zhang, Z., Zhou, J., Han, S., Kang, Z., Chuang, H., . . . Hu, D. (2021). Next-Generation Sequencing and Proteomics of Cerebrospinal Fluid From COVID-19 Patients With Neurological Manifestations. *Front Immunol*, 12, 782731. doi:10.3389/fimmu.2021.782731
- Wang, Y., Zhang, X., Ma, Y., Wang, Y., Zhan, W., Zheng, Q., . . . Liu, Q. (2022). Combating the SARS-CoV-2 Omicron (BA. 1) and BA. 2 with potent bispecific antibodies engineered from non-Omicron neutralizing antibodies. *Cell Discovery*, 8(1), 104.
- Wang, Z., Ye, D., Wang, M., Zhao, M., Li, D., Ye, J., . . . Wan, J. (2020). Clinical Features of COVID-19 Patients with Different Outcomes in Wuhan: A Retrospective Observational Study. *2020*, 2138387. doi:10.1155/2020/2138387
- WHO. (2020). World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV). Situation report-11. *Disponible en <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermeria-clinica-35-avance-resumen-aspectos-epidemiologicos-clinica-mecanismos-control-S1130862120302977>*.
- WHO. (2021). World Health Organization. Weekly Epidemiological Update on COVID-19 - 19 October 2021. *Disponible en <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---19-october-2021>*.
- Wilhelm, A., Toptan, T., Pallas, C., Wolf, T., Goetsch, U., Gottschalk, R., . . . Widera, M. (2021). Antibody-mediated neutralization of authentic SARS-CoV-2 B. 1.617 variants harboring L452R and T478K/E484Q. *Viruses*, 13(9), 1693.
- World Health Organization. (2020). *Clinical management of COVID-19: interim guidance*, 27 May 2020. Retrieved from
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., . . . Zhang, Y.-Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265-269. doi:10.1038/s41586-020-2008-3



- Xia, X. (2021). Domains and Functions of Spike Protein in Sars-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. *Viruses*, 13(1). doi:10.3390/v13010109
- Yang, K., Wang, C., Kreuzberger, A. J. B., White, K. I., Pfuetzner, R. A., Esquivies, L., . . . Brunger, A. T. (2023). Structure-based design of a SARS-CoV-2 Omicron-specific inhibitor. *120*(13), e2300360120. doi:doi:10.1073/pnas.2300360120
- Yang, K., Wang, C., White, K. I., Pfuetzner, R. A., Esquivies, L., & Brunger, A. T. (2022). Structural conservation among variants of the SARS-CoV-2 spike postfusion bundle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(16), e2119467119.
- Yang, T.-J., Yu, P.-Y., Chang, Y.-C., Liang, K.-H., Tso, H.-C., Ho, M.-R., . . . Hsu, S.-T. D. (2021). Effect of SARS-CoV-2 B.1.1.7 mutations on spike protein structure and function. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28(9), 731-739. doi:10.1038/s41594-021-00652-z
- Yang, W., Cao, Q., Qin, L., Wang, X., Cheng, Z., Pan, A., . . . Yan, F. (2020). Clinical characteristics and imaging manifestations of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19):A multi-center study in Wenzhou city, Zhejiang, China. *J Infect*, 80(4), 388-393. doi:10.1016/j.jinf.2020.02.016
- Yang, X.-J. (2021). δ 1 variant of SARS-COV-2 acquires spike V1176F and yields a highly mutated subvariant in Europe. *BioRxiv*, 2021.2010. 2016.463825.
- Yang, X.-J. J. b. (2021). SARS-COV-2 γ variant acquires spike P681H or P681R for improved viral fitness. 2021.2010. 2016.464641.
- Yavarian, J., Nejati, A., Salimi, V., Shafiei Jandaghi, N. Z., Sadeghi, K., Abedi, A., . . . Mokhtari-Azad, T. (2022). Whole genome sequencing of SARS-CoV2 strains circulating in Iran during five waves of pandemic. *PloS one*, 17(5), e0267847. doi:10.1371/journal.pone.0267847
- Zella, D., Giovanetti, M., Benedetti, F., Unali, F., Spoto, S., Guarino, M., . . . Ciccozzi, M. (2021). The variants question: What is the problem? *Journal of medical virology*, 93(12), 6479-6485. doi:https://doi.org/10.1002/jmv.27196
- Zeng, C., Evans, J. P., Qu, P., Faraone, J., Zheng, Y. M., Carlin, C., . . . Liu, S. L. (2021). Neutralization and Stability of SARS-CoV-2 Omicron Variant. *BioRxiv*. doi:10.1101/2021.12.16.472934
- Zeng, W., Liu, G., Ma, H., Zhao, D., Yang, Y., Liu, M., . . . Jin, T. (2020). Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 527(3), 618-623. doi:10.1016/j.bbrc.2020.04.136
- Zhang, L., & Jackson, C. B. (2020). SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *11*(1), 6013. doi:10.1038/s41467-020-19808-4
- Zhang, L., Li, Q., Liang, Z., Li, T., Liu, S., Cui, Q., . . . Huang, W. (2022). The significant immune escape of pseudotyped SARS-CoV-2 variant Omicron. *Emerg Microbes Infect*, 11(1), 1-5.
- Zhang, S., Go, E. P., Ding, H., Anang, S., Kappes, J. C., Desaire, H., & Sodroski, J. G. (2022). Analysis of glycosylation and disulfide bonding of wild-type SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *J Virol*, 96(3), e01626-01621.
- Zhang, Z., Wan, X., Li, X., & Wan, C. (2022). Effects of a Shift of the Signal Peptide Cleavage Site in Signal Peptide Variant on the Synthesis and Secretion of SARS-CoV-2 Spike Protein. *Molecules*, 27(19), 6688.



- Zhao, L. P., Lybrand, T. P., Gilbert, P. B., Payne, T. H., Pyo, C.-W., Geraghty, D. E., & Jerome, K. R. (2022). Rapidly identifying new coronavirus mutations of potential concern in the Omicron variant using an unsupervised learning strategy. *Scientific reports*, 12(1), 19089.
- Zhu, Y., Zhou, W., Niu, Z., Sun, J., Zhang, Z., Li, Q., . . . Sun, Q. (2022). Long-range enhancement of N501Y-endowed mouse infectivity of SARS-CoV-2 by the non-RBD mutations of Ins215KLRS and H655Y. *Biology direct*, 17(1), 1-11.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.