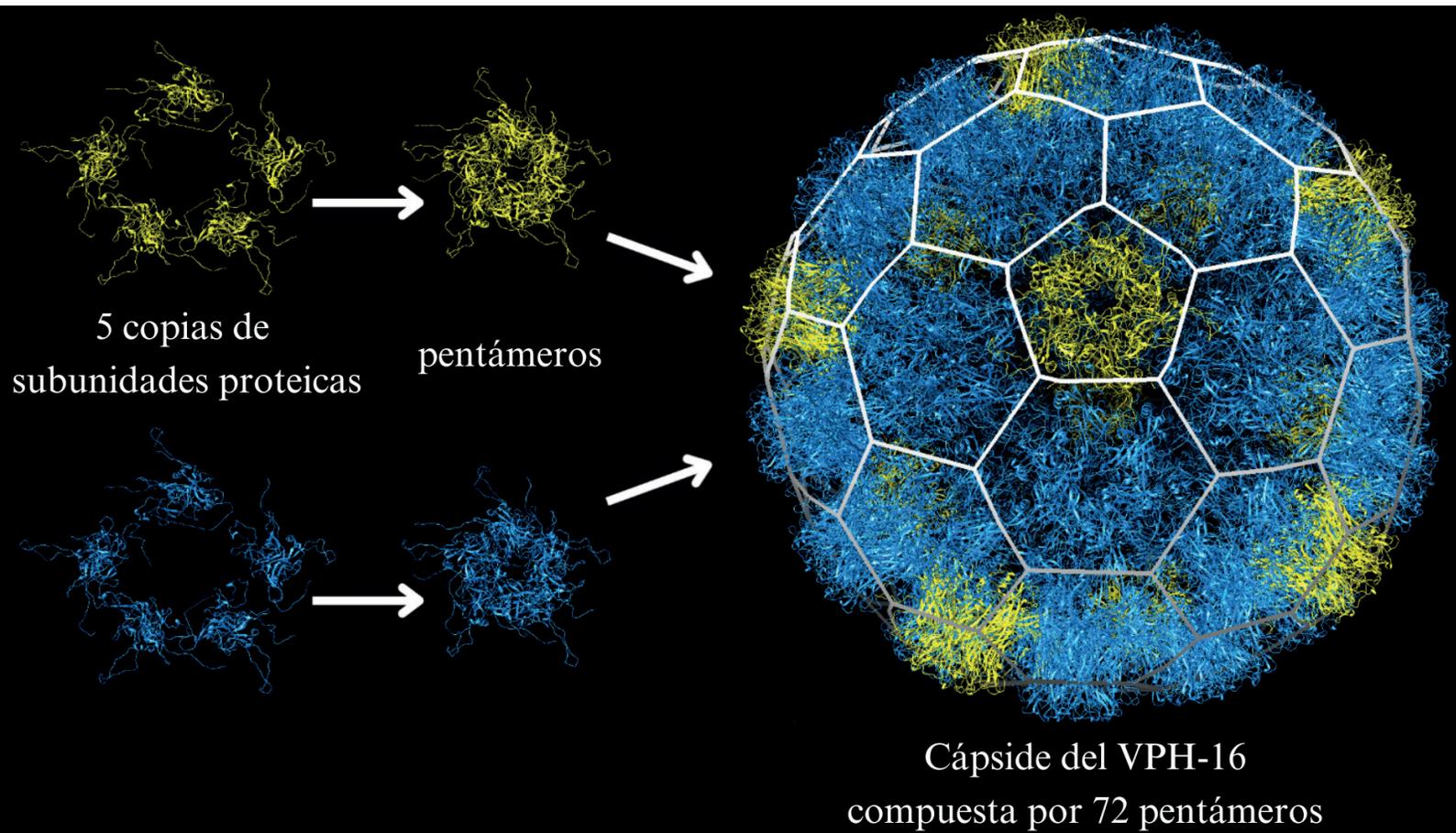


# Autoensamblaje de cápsides virales: Teoría y Simulación



Jason Peña<sup>1§</sup>  
David Hernández-León<sup>1§</sup>  
Leonardo Dagdug<sup>1</sup>  
David Reguera<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Física, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I). CDMX, México.

<sup>2</sup> Departamento de Física de la Materia Condensada, Universitat de Barcelona (UB). Barcelona, España.

<sup>3</sup> Universitat de Barcelona, Institute of Complex Systems (UBICS), Barcelona, España.

<sup>§</sup>En estancia de investigación en la Universitat de Barcelona. Barcelona, España.



**Abstract:**

Viruses, despite their diminutive size, undoubtedly play an important role in human life and history. Nowadays, virology constitutes a prominent and interdisciplinary research field with diverse applications within disciplines such as biology, biomedicine, and public health. The fascinating and uncommon properties of viruses, as well as the intricate mechanisms they follow in the replication cycle, have captured the attention of physics and the basic sciences, giving rise to the emerging and promising field of physical virology.

This article addresses the collaborative efforts of the Department of Condensed Matter Physics at Universidad de Barcelona (UB) and the Physics Department at Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I), to unravel, using statistical physics methodologies, one of the fundamental steps in the viral replication cycle: the assembly of the protein capsid that protects viral genetic material. It provides an overview of the theoretical framework employed to model Viral Capsid Self-Assembly (VCSA), rooted in Classical Nucleation Theory (CNT), focusing on viruses whose capsids exhibit spherical symmetry. This framework incorporates key physical factors, such as protein concentration, temperature, and edge energy, which are critical determinants of the assembly process. Within this context, the role of bending energy is analyzed, as it can potentially alter assembly pathways and open the door to novel strategies to interfere with virus formation. This article further explores the utility of Molecular Dynamics (MD) simulations as a powerful computational tool to characterize the interactions between capsid proteins of specific viruses, such as the Human Papillomavirus (HPV). By analyzing the-

se simulations, valuable insights can be obtained into the mechanisms of capsid assembly and disassembly, which are fundamental for a deeper understanding of viruses and the development of innovative antiviral strategies.

**Resumen:**

Es indudable que, a pesar de ser entidades biológicas diminutas, los virus juegan un papel primordial en la vida y el desarrollo de la historia de la humanidad. Por ello su estudio despierta un gran interés en diversas disciplinas científicas del ámbito de la biología, la biomedicina y la salud pública. Sus fascinantes y poco comunes propiedades, y los intrincados mecanismos que utilizan durante su ciclo de replicación también han atraído la atención de la física y las ciencias básicas dando lugar al emergente y prometedor campo de la virología física.

Este artículo describe los esfuerzos de colaboración entre el Departamento de Física de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I) y el Departamento de Física de Materia Condensada de la Universidad de Barcelona (UB) para desentrañar, utilizando metodologías de la física estadística, uno de los pasos fundamentales en el ciclo de replicación de los virus: el ensamblaje de la cápside de proteínas que protege el material genético viral. Se proporciona una descripción general del marco teórico utilizado para modelar el Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV), basado en la Teoría Clásica de Nucleación (TCN), centrándose en cápsides con estructuras esféricas. Este marco incorpora factores físicos clave, como la concentración de proteínas, la temperatura y la energía de borde, que son críticos en el proceso de ensamblaje. Dentro de esta descripción, se incluye y analiza el papel

de la energía de flexión, que altera el resultado del ensamblaje y podría abrir una nueva ruta para interferir con el proceso de formación de virus. Finalmente, se discute cómo las simulaciones de Dinámica Molecular (DM) pueden emplearse como una potente herramienta computacional para caracterizar las interacciones entre las proteínas de la cápside de virus específicos, como el Virus de Papiloma Humano (VPH). A través del análisis de estas simulaciones, se podría obtener información sobre los mecanismos de ensamblaje y desensamblaje de la cápside, fundamentales para una mejor comprensión de los virus y el desarrollo de novedosas estrategias antivirales.

**Keywords:** viral capsids, self-assembly, physical virology, Molecular Dynamics

**Palabras clave:** cápsides virales, autoensamblaje, virología física, Dinámica Molecular

### Introducción

*¿Por qué son importantes los virus?*

Los virus, entidades biológicas nanométricas que no poseen vida autónoma y requieren de una célula para replicarse, han sido objeto de intensa investigación debido a sus variadas aplicaciones en campos científicos que abarcan desde la biología y la biotecnología hasta la medicina, y más recientemente, en ciencias básicas como la química y la física (Dimitrov, 2004; Shirbaghaee y Bolhassani, 2016; Buzón et al., 2020).

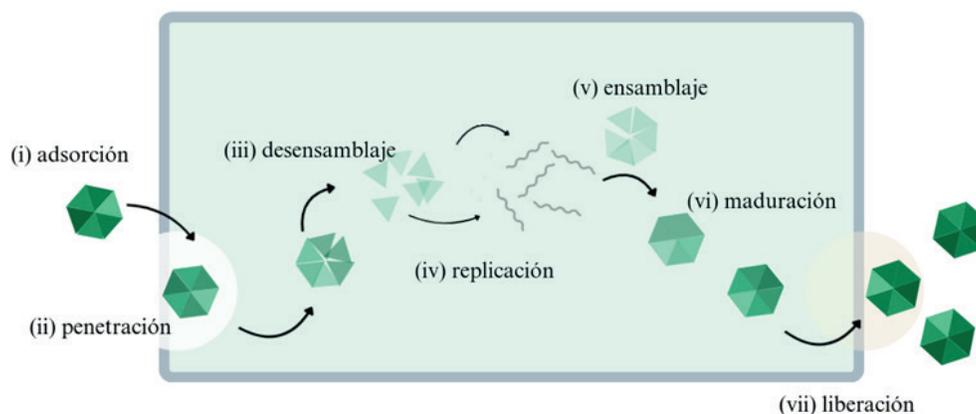
Estos agentes invasores han estado presentes a lo largo de la historia de la humanidad, y las consecuencias de su interac-

ción con bacterias, animales y humanos han marcado grandes acontecimientos históricos, como las *pandemias*, que en diversas ocasiones han marcado el rumbo de la sociedad en el mundo entero. La pandemia de la gripe española, que comenzó en 1918 debido al virus de la gripe A del tipo H1N1, se destaca como una de las más mortíferas de la historia (Smith, 1963). Más recientemente, la pandemia desencadenada por el virus SARS-CoV-2 en 2019 afectó a millones de personas en todo el mundo en múltiples aspectos. Estos eventos, entre muchos otros, subrayan la importancia de comprender a fondo qué son y cómo funcionan los virus con el fin de idear estrategias innovadoras para prevenir y tratar enfermedades virales, e.g., a través de la creación de partículas similares a virus con el propósito de desarrollar vacunas y sistemas controlados de liberación de fármacos (Mejía-Méndez et al., 2022); o impidiendo directamente la replicación de los virus en el organismo al interferir con alguno de los pasos en su ciclo de replicación.

*Los virus, sus componentes y el ciclo de replicación*

Un virus, en su forma más simple, se compone de una cadena de material genético, que puede ser ADN o ARN, y una cápside proteica (Mateu M. G., 2013) formada típicamente por múltiples copias de un tipo, o unos pocos tipos, de proteínas organizadas alrededor del ácido nucleico.<sup>1</sup> El conjunto formado por los ácidos nucleicos y la cápside recibe el nombre de nucleocápside. En algunos casos, los virus están recubiertos adicionalmente de una envoltura membranosa, que se adquiere al salir de

<sup>1</sup> Estas proteínas reciben el nombre de subunidades proteicas y, junto con el genoma viral, se replican utilizando la maquinaria biológica de la célula infectada, también llamada célula huésped.



*Figura 1: Representación esquemática del ciclo de replicación de un virus. Los pasos clave de este proceso incluyen la unión del virus a la célula huésped, la entrada del genoma viral (ADN o ARN), la síntesis de proteínas virales, el ensamblaje de la nucleocápside y la liberación de nuevas partículas virales.*

*Ilustración generada con GIMP, GNU Image Manipulation Program, un software de código abierto.*

la célula huésped y, por lo tanto, está compuesta de los mismos ingredientes que los de la membrana celular. Es decir, los virus envueltos (recubiertos con una envoltura membranosa) están rodeados de una bicapa lipídica que les brinda protección y en algunos casos también de unas proteínas accesorias que les facilita la entrada a una célula susceptible.

Uno de los aspectos más sorprendentes de los virus es que, a pesar de su aparente sencillez biológica, tienen una alta capacidad para replicarse de un modo muy eficiente en una amplia variedad de células (Dimitrov, 2004). Las células infectadas son utilizadas como fábricas de proteínas y ácidos nucleicos para la nueva progenie viral. Desde la perspectiva de la virología física, el proceso de replicación viral obedece a una serie de mecanismos en muchos casos espontáneos (Luque y Reguera,

2013) que son capaces de generar múltiples copias de un virus, preservando y protegiendo la integridad del material genético, especialmente frente a condiciones ambientales extremas como variaciones de presión, fuerza iónica y temperatura.

La replicación de los virus difiere entre especies y categorías de virus. Sin embargo, el ciclo de replicación viral, esquematizado en la Figura 1, puede categorizarse generalmente en siete etapas<sup>2</sup>: (i) adsorción, (ii) penetración, (iii) desensamblaje, (iv) replicación, (v) ensamblaje, (vi) maduración y (vii) liberación.

Durante las diferentes etapas de la infección, la cápside viral puede sufrir cambios drásticos en las condiciones ambientales de presión, fuerza iónica, temperatura y niveles de pH que difieren notablemente de las condiciones de ensamblaje, y que

<sup>2</sup> Es importante mencionar que no todos los virus siguen todas las etapas. Por ejemplo, los virus que infectan bacterias generalmente no se desensamblan ni penetran en la célula huésped, sino que inyectan el material genético a través de su membrana, permaneciendo en el exterior.

hacen que pase de estados de alta estabilidad, en los que la cápside representa una coraza que protege el genoma, a estados inestables, que permiten la liberación del material genético en la célula huésped (Mateu M. G., 2013). Es evidente entonces que las cápsides desempeñan un papel esencial en el ciclo de replicación viral y por eso el estudio de su formación y propiedades es tan relevante.

#### *Autoensamblaje de Cápsides Virales*

En condiciones adecuadas, la cápside de un virus puede ensamblarse de tres maneras distintas: (i) exclusivamente con subunidades proteicas, (ii) en combinación con el material genético, o (iii) con proteínas de andamiaje. En todos los casos, el ensamblaje sigue ciertos patrones generales que han sido identificados para ser modelados usando ideas de la física estadística (Zandi et al., 2006; Luque y Reguera, 2013; Aznar y Reguera, 2016). Por ejemplo, el ensamblaje de numerosos virus de forma esférica como el Virus del Papiloma Humano (VPH), ocurre de forma espontánea sin ayuda de agentes externos, guiándose por la minimización de la energía libre asociada a las interacciones entre las subunidades proteicas (Luque y Reguera, 2013).

La estructura supramolecular resultante de ésta cápside tiene una arquitectura específica, en la mayoría de los casos esférica con simetría icosaédrica, en donde la precisión en la estructura y en las propiedades mecánicas, *e.g.*, elasticidad, dureza, fatiga del material y resistencia al estrés osmótico, son esenciales para garantizar que el material genético se mantenga en condiciones óptimas mientras el virus flota sin rumbo hasta encontrar un huésped susceptible.

De acuerdo con los registros históricos (Smith, 1963), en 1955, el autoensamblaje viral se replicó por primera vez *in vitro* para el Virus del Mosaico de Tabaco (VMT) (un virus helicoidal con forma de bastón) a partir de su genoma purificado y las subunidades proteicas. Posteriormente, en 1967, se informó sobre el primer ensamblaje *in vitro* de un virus icosaédrico, el Virus del Moteado Clorótico del Cauquí (VMCC). Estos experimentos demostraron que se podían estudiar procesos virales complejos en condiciones artificiales controladas, pero similares a las fisiológicas, abriendo nuevas posibilidades para estudiar los mecanismos de autoensamblaje desde una perspectiva fisicoquímica. Lo que resulta aún más sorprendente es que en las condiciones adecuadas, y para ciertos virus, las subunidades proteicas se agregan espontáneamente incluso en ausencia de material genético para producir cápsides vacías que pueden ser de tamaños distintos a los del virus nativo.

El principal objetivo de este artículo es brindar una revisión a los fundamentos físicos esenciales para estudiar el Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV) esféricas mediante modelos teóricos y simulaciones computacionales de Dinámica Molecular (DM). Por un lado, los modelos teóricos describen, en términos de magnitudes experimentalmente medibles, la formación de una cápside a partir de subunidades proteicas individuales. Por otro lado, la implementación de simulaciones de DM permiten estimar el valor de los principales ingredientes del modelo teórico para virus reales, abriendo la puerta a hacer predicciones del ritmo y las condiciones a las cuales se forman. Estos esfuerzos conjuntos tienen como objetivo arrojar luz sobre los aspectos menos comprendidos del

AECV y así brindar información valiosa a la comunidad científica, particularmente en el campo de la biotecnología, la salud pública y el desarrollo de antivirales.

En la siguiente sección se exponen los métodos y resultados de la Teoría Clásica de Nucleación (TCN) de cápsides virales, que ofrece predicciones del mecanismo y del ritmo al cual se ensamblan las cápsides esféricas, asumiendo que el radio es constante. Además, se discute la influencia de la energía de flexión en el AECV y sus consecuencias en el proceso de formación de las cápsides.

### Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales

#### Teoría Clásica de Nucleación de Cápsides Virales

La formación de la cápside ocurre mediante un proceso de *nucleación* (Zandi et al., 2006), en el cual el efecto de competición entre la energía que favorece la unión de las proteínas y el coste energético asociado a la tensión lineal en el borde de la cápside genera una *barrera de energía*,  $\Delta G^*$ ,

que debe superarse para conseguir espontáneamente el autoensamblaje de una cápside cerrada (ver Figura 2). En las condiciones ambientales adecuadas, es decir, concentraciones apropiadas de subunidades libres y factores como la salinidad, pH y temperatura, las fluctuaciones térmicas inducen la formación de pequeños agregados de proteínas. Estas cápsides parcialmente formadas son energéticamente desfavorables y tienden a disolverse espontáneamente a menos que alcancen un *tamaño crítico*,  $n^*$ . Más allá de este tamaño, la adición progresiva de subunidades, que podrían ser, dependiendo del virus, proteínas de cápside individuales, dímeros, trímeros, pentámeros o hexámeros, es favorable y la cápside crece hasta cerrarse. En la Figura 2, se ilustra y describe en términos simples, el AECV.

En la descripción estándar de la TCN para modelar el AECV se asume que la cápside se forma y crece a radio constante. En este contexto, la *energía libre de Gibbs de formación* de una cápside parcial que

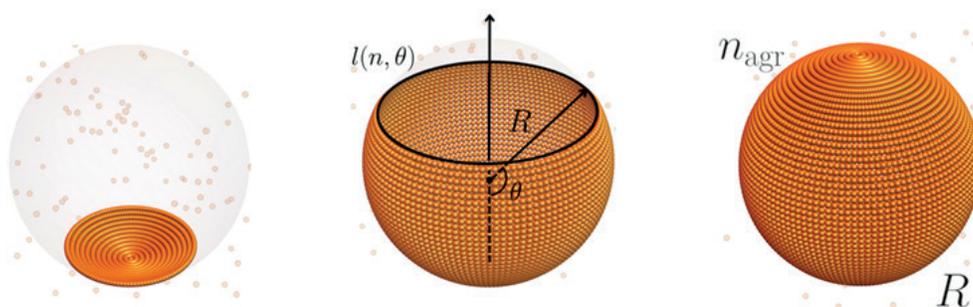


Figura 2: Representación esquemática del AECV. El proceso de autoensamblaje se despliega de izquierda a derecha: Inicialmente, las subunidades libres, previamente dispersas en la solución, comienzan a asociarse por fluctuaciones térmicas formando pequeños agregados que actúan como embrión de la cápside. Estas cápsides parciales pueden crecer o decrecer en tamaño y se caracterizan por tener un borde expuesto de longitud  $l(n)$ , cuya magnitud depende del número de subunidades instantáneas,  $n$ . Cuando la cápside en formación supera un tamaño crítico  $n^*$  su crecimiento es favorable y al culminar, la cápside completa consta de  $n_{agr}$  subunidades, siendo  $n_{agr}$  el número de agregación. Durante todo el proceso, los agregados intermedios presentan un radio  $R$ , el cual, en el tratamiento clásico, se asume como constante.

contiene  $n$  subunidades, se puede formular como sigue (Zandi et al., 2006):

$$\Delta G(n) = n\Delta\mu + \tau_\lambda l(n) = n\Delta\mu + \lambda\sqrt{n(n_{agr} - n)}, \quad (1)$$

en donde  $n$  es el número instantáneo de subunidades,  $\Delta\mu$  la diferencia de potencial químico<sup>3</sup>,  $l(n)$  la longitud del borde de una cápside parcial (ver Figura 2) y  $\lambda \equiv 4\pi R\tau_\lambda/n_{agr}$  la constante de energía de borde que depende de la tensión lineal  $\tau_\lambda$ . Esta última cantidad puede estimarse en términos de la energía de enlace efectiva entre subunidades, i.e.,  $\Delta g$  (un parámetro que se puede evaluar experimentalmente y a través de simulaciones computacionales como se muestra más adelante)<sup>4</sup>. La energía libre del sistema se compone de un primer término que impulsa el autoensamblaje,  $n\Delta\mu$ , y un segundo término que representa una penalización a la energía asociada al borde de la cápside,  $\tau_\lambda l(n)$ . La competición de estas dos contribuciones opuestas da lugar a la barrera de energía,  $\Delta G^*$  que ha de superarse para formar una cápside. Para calcular la altura de esta barrera  $\Delta G^*$  es necesario localizar el punto en el que  $\Delta G(n)$  es máxima, es decir, el tamaño crítico del núcleo,  $n^*$ . A tal efecto, resulta conveniente introducir la supersaturación  $\Gamma$  definida como:  $\Gamma \equiv -\Delta\mu/\lambda$ . Al establecer que  $(\frac{\partial\Delta G(n)}{\partial n})_{n=n^*} = 0$  y resolver para  $n^*$  se encuentra el tamaño mínimo o crítico que una cápside parcial ha de alcanzar por fluctuaciones térmicas

para poder comenzar a crecer de manera espontánea. Haciendo uso de este procedimiento se obtiene que (Zandi et al., 2006)

$$n^* = \frac{n_{agr}}{2} \left( 1 - \frac{\Gamma}{\sqrt{\Gamma^2 + 1}} \right). \quad (2)$$

Al sustituir este resultado en la Ec. (1), se encuentra la altura de la barrera de energía, a saber,

$$\Delta G^* = \frac{n_{agr}\lambda}{2} (\sqrt{\Gamma^2 + 1} - \Gamma). \quad (3)$$

Para  $n < n^*$ , la energía libre crece a medida que más subunidades se unen al agregado ( $\partial\Delta G(n)/\partial n > 0$ ), lo que implica que los intermediarios de tamaño  $1 < n < n^*$  tienden a disolverse espontáneamente en subunidades libres. En contraste, los agregados con  $n \geq n^*$  tendrán una reducción de energía libre cuando se añadan más subunidades ( $\partial\Delta G(n)/\partial n < 0$ ) y tenderán a crecer espontáneamente hasta completar la cápside con  $n_{agr}$  subunidades.

La importancia de la barrera de nucleación  $\Delta G^*$  es que es el factor determinante en el ritmo de formación de cápsides  $J$ , i.e. el número de cápsides que se forman por unidad de volumen y tiempo, que como en cualquier otro proceso activado va como  $J \sim \exp(-\beta\Delta G^*)$  (Vehkamäki, 2006). Las Ecs. (2) y (3) predicen que tanto el tamaño crítico como la altura de la barrera,

<sup>3</sup> Físicamente, la diferencia de potencial químico indica el cambio de energía asociado con la adición de una molécula o partícula a un sistema mientras se mantiene constante la temperatura, la presión y el número total de partículas. En el contexto de la TCN de cápsides virales,  $\Delta$  indica la diferencia entre la energía de una subunidad libre en la solución o formando parte de una cápside. En síntesis, si la diferencia de potencial químico es menor a cero, las subunidades “prefieren” formar parte de una agregado en vez de mantenerse libres en solución.

<sup>4</sup> La diferencia de potencial químico depende de la concentración de subunidades proteicas en la solución de autoensamblaje y la energía de enlace efectiva entre subunidades de factores como la salinidad y pH.

exhiben un decaimiento monótono al incrementar la supersaturación,  $\Gamma$ , tal como se observa en las líneas discontinuas de la Fig. 3, indicando que la formación de cápsides es más rápida y favorable (Luque y Reguera, 2013).

### *Influencia de la energía de flexión en el AECV*

Como se dijo anteriormente, la descripción continua del AECV que formula la TCN asume que la cápside se forma a radio constante. Sin embargo, debido a la curvatura natural que adquiere la cápside, y a la existencia de un ángulo preferido de interacción entre las piezas de ensamblaje, la acumulación de energía elástica debe ser también considerada en la formulación de la energía libre,  $\Delta G$ , con el objetivo de capturar los mecanismos de AECV de manera más adecuada. La penalización por efectos de curvatura puede incluirse directamente en la energía libre de autoensamblaje, Ec. (1), como un término adicional,  $G_{ela}$ , *i.e.*,

$$\Delta G = n \Delta \mu + \lambda l(n, R) + G_{ela}, \quad (4)$$

siendo  $G_{ela} = G_{plano} + G_{flex}$  y  $l(n, R)$  la longitud del borde de la cápside, ahora en términos del número instantáneo de subunidades,  $n$ , y el *radio instantáneo de curvatura*,  $R$ . La contribución elástica  $G_{ela}$  está asociada tanto a la compresión en el plano,  $G_{plano}$ , como a la energía de flexión,  $G_{flex}$ . Esta contribución elástica puede llegar a generar un mecanismo de autoensamblaje autolimitante que conlleva la formación de cápsides parciales abiertas atrapadas en un tamaño finito y que no pueden cerrarse (Hagan M. y Grason G., 2021). También puede alterar cuál es la forma preferida por la cápside, llegando a generar estructuras cilíndricas o tiras

curvadas en vez de cápsides esféricas, que comprometerían la viabilidad del virus (Mendoza y Reguera, 2020).

Este artículo se enfoca en analizar la influencia de la energía de flexión,  $G_{flex}$ , en el AECV en el límite en el que la energía de compresión en el plano puede ser ignorada.

La forma más simple de modelar esta contribución es introduciendo una energía de flexión similar a la de una membrana (Hagan M. y Grason G., 2021)

$$G_{flex} = \frac{\kappa}{2} \int_{\Omega} \left( \frac{l}{R} - \frac{l}{R_T} \right)^2 dA, \quad (5)$$

en donde  $\kappa$  es el *módulo de flexión*,  $R_T$  el *radio de curvatura preferencial* (asociado al ángulo de interacción preferido entre las subunidades de la cápside) con un *número de agregación preferencial*  $n_T$  y  $\Omega$  la superficie de la cápside en formación, la cual se asume como un casquete esférico de radio uniforme  $R$ . Incorporando la energía de flexión en la Ec. (4), y escribiendo la longitud de borde en términos de  $n$  y  $R$ , finalmente se encuentra que la energía de formación toma la siguiente forma:

$$\Delta G(n, R) = \left\{ n_r \left[ f_r \left( \frac{l}{R_r} - l \right)^2 - \Gamma \right] + \sqrt{n_r \left( 1 - \frac{n_r}{R_r^2} \right)} \right\} \lambda n_T, \quad (6)$$

en donde se ha definido la *constante de flexión*,  $f_r \equiv 2\pi \kappa / \lambda n_T$ , y las cantidades  $n_r \equiv n / n_T$  y  $R_r \equiv R / R_T$ . Debido a que ahora la energía libre de autoensamblaje tiene dos grados de libertad, el núcleo crítico tendrá dos componentes, *i.e.*,  $(n^*, R^*)$ , que corresponden al tamaño y el radio críticos, y que se calculan haciendo que las primeras derivadas de  $\Delta G$ , respecto a  $n$  y a  $R$ , sean cero. Este procedimiento da como resultado:

$$n^* = \frac{\zeta - 1 + 4 f_r [\Gamma + f_r (\zeta - 4 f_r \Gamma - 3)]}{8 \zeta (f_r - \Gamma)^2} n_T \quad \text{y}$$

$$R^* = \frac{1 + 4 f_r (2 f_r - \Gamma) - \zeta}{8 f_r (f_r - \Gamma)} R_T. \quad (7)$$

en donde  $\zeta \equiv \sqrt{1 + 8 f_r [2 f_r (1 + \Gamma^2) - \Gamma]}$ . Más aún, al sustituir estas *coordenadas críticas* en la Ec. (6) se obtiene la altura de la barrera de energía para este caso de AECV con energía de flexión. En la Figura 3, se muestra el comportamiento de  $\Delta G^*$  y  $n^*$  en función de  $\Gamma$  para diferentes valores de  $f_r$ , ambos en su forma escalada. De estos gráficos se puede concluir que el efecto de competición entre la energía característica de borde  $\lambda$  y la de flexión  $\kappa$ , representada por el parámetro adimensional  $f_r$ , disminuye la altura de la barrera de energía y el tamaño crítico del núcleo. Mientras más rígida sea la cápside (mientras mayor sea  $f_r$ ) más difícil es para un agregado intermedio desviarse de la curvatura preferencial  $R_T$ . En el límite cuando  $f_r \rightarrow \infty$ , domina la energía de flexión que penaliza cualquier desviación de la curvatura respecto al radio prefe-

rencial  $R_T$  y se recuperan los resultados del modelo clásico de AECV, i.e., aquellos descritos por las Ecs. (2) y (3).

Como el ritmo de nucleación depende de manera exponencial con la altura de la barrera,  $J \sim \exp(-\beta \Delta G^*)$  (Vehkamäki, 2006), esto se traduce en que el ritmo al que se ensamblan los cápsides aumenta, en comparación con el modelo que se describe con la Ec. (1), si la energía de flexión es considerada. El mecanismo físico que explica este fenómeno es el siguiente. Si el coste de flexión es pequeño comparado con la energía de borde, una cápside parcialmente formada con un número dado de subunidades puede reducir su energía de borde disminuyendo ligeramente el radio a costa de una pequeña penalización en energía de flexión. La principal consecuencia de este mecanismo es que conduce al cierre prematuro de la cápside con un *radio de cierre*,  $R_c$  y número de subunidades  $n_c$  más pequeño que los valores óptimos  $R_T$  y  $n_T$  (Hagan M. y Grason G., 2021). Se pueden calcular matemáticamente estos valores de cierre a partir

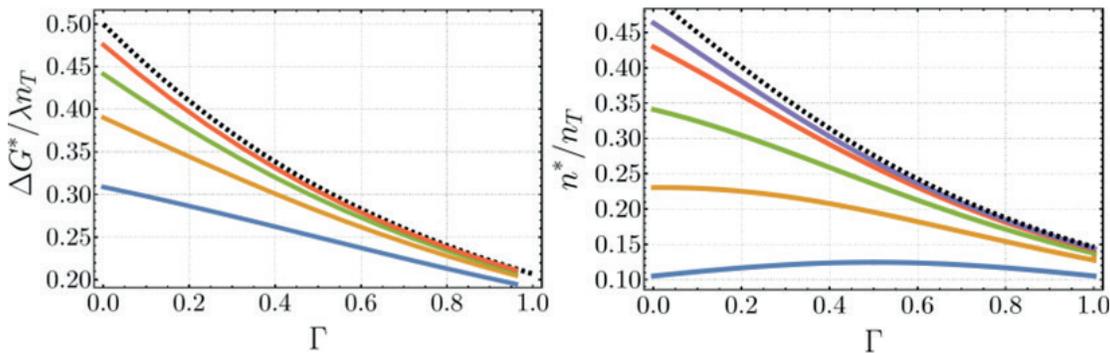


Figura 3: Altura de la barrera de energía (panel izquierdo) y el tamaño crítico (panel derecho), ambos en su forma escalada, en función de la supersaturación,  $\Gamma$ , para distintos valores de la constante de flexión,  $f_r$ . En ambos casos, se observa la aproximación al resultado clásico de las Ecs. (2) y (3) en el límite  $f_r \rightarrow \infty$ . Las dos gráficas se generaron con los siguientes valores de la constante de flexión:  $f_r = 0.5$  (línea azul),  $f_r = 1.0$  (línea amarilla),  $f_r = 2.0$  (línea verde),  $f_r = 5.0$  (línea naranja) y  $f_r = 10.0$  (línea morada).

de la trayectoria de mínima energía en el paisaje de energía determinado por  $(R, n)$ , obteniendo

$$n_c = \frac{8f_r^2}{(2^{1/3} + 2f_r^{2/3})^3} n_T \text{ y } R_c = \sqrt{n_c}. \quad (8)$$

Es importante mencionar que tanto  $n_c$  como  $R_c$  dependen únicamente de  $f_r$ , es decir, el efecto de competición entre la penalización energética del borde y de las desviaciones de curvatura preferencial. Por ejemplo, para una cápside T=4, cuyo número de agregación preferencial es  $n_T=120$ , y que tiene asignados los valores  $\Delta g \approx -15 \text{ k T}$ ,  $\Delta\mu = -1.0 \text{ k T}$  y  $\kappa \approx 100 \text{ k T}$ , se encuentra que  $\Gamma=2.78$  y  $f_r=7.30$ . En estas condiciones, el número de cierre y el radio de cierre resultan ser  $n_c=0.62 n_T$  y  $R_c=0.79 R_T$ , respectivamente. En otras palabras, la inclusión de la energía de flexión en estas condiciones hace que la cápside se cierre cuando tiene aproximadamente un 60% de las subunidades de la cápside nativa, en este caso, alrededor de 72 subunidades. En estas circunstancias, el radio de la cápside comprimida es aproximadamente un 20% menor que el radio preferencial de la cápside.

Los dos modelos de autoensamblaje presentados en esta sección (véase las Ecs. (1) y (6)) dependen de parámetros físicos y químicos del entorno en donde se realiza el autoensamblaje. Estos parámetros son esencialmente: (i) la energía de enlace efectiva  $\Delta g$ , (ii) la diferencia de potencial químico,  $\Delta\mu$ , (iii) el módulo de flexión,  $\kappa$  y el radio de curvatura preferido  $R_T$ . La di-

ferencia de potencial químico está directamente relacionada con la concentración de subunidades libres en la solución de autoensamblaje, de manera que se puede controlar experimental y computacionalmente. Pero la energía de enlace efectiva, el módulo de flexión y el radio preferencial son datos que deben extraerse de resultados experimentales y computacionales (Buzón et al., 2020). No obstante, determinar estas cantidades es complicado y actualmente no se cuenta con una estimación precisa de estos elementos para virus concretos. En la siguiente sección, se explica cómo la simulación atomística mediante DM puede utilizarse para determinar estos ingredientes de la interacción efectiva entre *capsómeros*<sup>5</sup>.

### **Dinámica Molecular para determinar las interacciones efectivas que controlan el Autoensamblaje de Cápsides Virales**

La DM es una técnica computacional que permite reproducir la evolución en el tiempo de un sistema físico compuesto por una gran cantidad de partículas. En esta técnica se resuelven de manera numérica las ecuaciones de movimiento de Newton para un sistema compuesto por muchas partículas que interactúan entre sí. Para resolver estas ecuaciones es necesario utilizar un algoritmo de integración e introducir campos de fuerza que describan la forma en cómo interactúan estas partículas.

Con esta herramienta es posible determinar el comportamiento dinámico de sistemas moleculares con un alto nivel de preci-

<sup>5</sup> Los capsómeros son las unidades morfológicas observables en una cápside, es decir, los bloques de construcción compuestos de una o más subunidades proteicas. Por ejemplo, la cápside del VPH se autoensambla a partir de capsómeros compuestos por cinco subunidades proteicas. Es decir, los capsómeros del VPH son pentámeros.

sión, además de ser muy útil para explorar condiciones experimentales que pueden ser difíciles de replicar en el laboratorio. Esto permite realizar experimentos virtuales *in silico*, lo que acelera el proceso de investigación y puede guiar la planificación de experimentos reales.

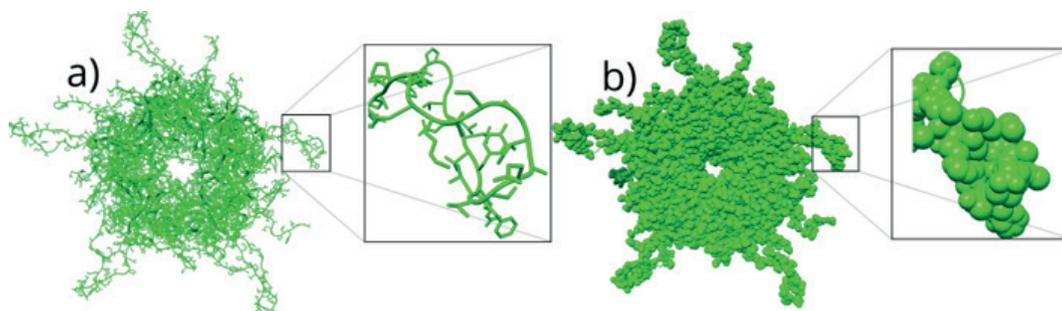
La precisión y el detalle a nivel atómico que ofrecen estas simulaciones es vital para la comprensión de las distintas etapas del ciclo de replicación de los virus. Sin embargo, estos cálculos generan una gran demanda computacional que aumenta significativamente con el número de partículas en el sistema, con la complejidad de las interacciones modeladas y con la escala de tiempo del proceso que se quiere estudiar. Es por ello que las simulaciones atómicas del proceso de ensamblaje, en el que están involucradas millones de átomos inmersos en un entorno acuoso y que requiere alcanzar escalas de tiempo que pueden llegar a ser de minutos u horas, siguen siendo inaccesibles incluso para los virus más pequeños.

Una alternativa a los modelos atómicos, son los Modelos de Grano Grueso (MGG). Estos modelos reducen la comple-

jididad de las interacciones moleculares al agrupar átomos y moléculas en unidades estructurales efectivas que interactúan a través de potenciales relativamente simples. Con esto se consigue reducir significativamente el número de partículas del sistema, los grados de libertad e ignorar los detalles atómicos que suelen ser innecesarios para modelar las propiedades macroscópicas más relevantes. En consecuencia, estos modelos son simples, computacionalmente eficientes y ofrecen una valiosa comprensión de los mecanismos físicos básicos, a menudo difíciles de obtener mediante otros métodos.

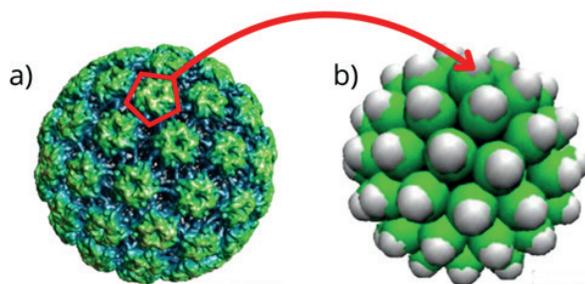
Las simulaciones basadas en los MGG se pueden realizar a diferentes niveles de resolución (Luque y Reguera, 2013). Existen los modelos a base de residuos (ver Figura 4), en donde los aminoácidos de la estructura proteica, son reemplazados por unidades efectivas de interacción. Este enfoque permite reducir la complejidad de las proteínas mientras se conservan las características estructurales y funcionales clave.

Otro nivel de resolución son los MGG de baja granularidad (ver Figura 5). En estos



*Figura 4: Representación esquemática de un MGG a base de residuos, aplicado a un capsómero del Virus de Papiloma Humano tipo 16 (VPH-16). a) En el panel izquierdo, se aprecia la representación atómica de las proteínas que conforman el capsómero, tomada del Protein Data Bank (código: 7kzf). b) En el panel derecho, se muestra el MGG, donde cada uno de los aminoácidos que componen a la proteína se reemplaza por una unidad efectiva de interacción.*

modelos, las proteínas y/o capsómeros se representan como partículas individuales o agregados de partículas y se simula su interacción y difusión en función de potenciales simplificados. Son útiles para estudiar cómo las proteínas virales se encuentran y se unen durante el proceso de AECV y pueden capturar las características esenciales sin la necesidad de simular cada átomo individualmente, permitiendo estudiar el proceso de ensamble en escalas de tiempo más grandes y realistas. Sin embargo, se pueden utilizar simulaciones atomísticas de DM para determinar los ingredientes esenciales que aparecen en la descripción teórica del AECV y en los modelos de grano grueso. Por ejemplo, mediante DM es posible reconstruir los Potenciales de Fuerza Media (PMF) entre las subunidades estructurales que forman la cápside, y a partir de él, extraer la energía de enlace efectiva entre capsómeros, a saber  $\Delta g$ , uno de los parámetros clave en el AECV.



*Figura 5: Representación esquemática de un MGG de baja granularidad, aplicado a la cápside del VPH-16. a) En el panel izquierdo, se aprecia la superficie de la cápside real del VPH-16, tomada del Virus Particle Explorer. b) En el panel derecho, cada capsómero del VPH-16 es reemplazado por una unidad efectiva de grano grueso. Imagen adaptada de Aznar y Reguera, 2016.*

De manera similar, se pueden implementar simulaciones para evaluar cuál es el ángulo de interacción preferido entre subu-

nidades y cuál es el coste de flexión requerido para desviarlas de este ángulo. Estas propiedades son de gran interés para la comunidad científica debido a su importancia en la formación de cápsides virales y no son fáciles de obtener experimentalmente. En nuestro grupo de trabajo se están desarrollando métodos que combinan simulaciones atomísticas para determinar estos ingredientes de la interacción con modelos de grano grueso para simular el proceso de autoensamblaje a escalas de tiempo grande. Con ello se pretende obtener una mejor comprensión del AECV, estudiando como caso particular, el VPH-16.

### Conclusiones

Usando las herramientas de la TCN, el fenómeno de AECV puede ser concebido como una transición de fase de primer orden entre el estado de las proteínas libres en solución y el estado agregado donde forman parte de la cápside. Las cantidades clave para describir este fenómeno son el trabajo de formación de un agregado con  $n$  subunidades,  $E_c$  (1), el tamaño crítico del núcleo,  $E_c$  (2) y la altura de la barrera energética,  $E_c$  (3), que se ha de superar para formarlos. En términos simples, la barrera de energía cumple varias funciones cruciales: (i) Previene la formación de cápsides hasta que se haya alcanzado una concentración suficiente de proteínas (ii) Evita la formación de agregados intermedios (energéticamente desfavorables) que podrían consumir todas las subunidades proteicas y conducir al arresto cinético o presentar malformaciones que no cumplen con los requisitos del virus para empaquetar el material genético. (iii) Impide la disolución de una cápside completamente formada, dado que la barrera que dificulta su formación espontánea también previene su desensamblaje.

Los efectos físicos más importantes que se observan debido a la inclusión de la energía de flexión son la reducción del tamaño del núcleo crítico y de la altura de la barrera de energía que requiere su formación (véase la Figura 3). Esto se debe a la competición efectiva entre las penalizaciones energéticas de borde y flexión, que hace que la cápside se cierre a un tamaño más pequeño que el óptimo. El tamaño subóptimo de la cápside se puede determinar usando la Ec. (8). Como consecuencia, sería potencialmente posible fomentar la formación de cápsides de tamaños subóptimos que podrían impedir o interferir con la correcta replicación de virus específicos. Esto podría resultar especialmente útil para diseñar experimentos en condiciones que impidan la formación de virus o garanticen la producción eficiente de cápsides en escalas de tiempo razonables para distintas aplicaciones nanotecnológicas.

Las simulaciones por computadora constituyen una herramienta muy valiosa para determinar los parámetros físicos que aparecen en la teoría de AECV y poder predecir las condiciones y la cinética del ensamblaje de virus específicos. En particular, las simulaciones de DM son una pieza fundamental para el avance de la virología. Permiten modelar virus en ambientes extracelulares y simular procesos activos de su ciclo de replicación. Además, estas simulaciones ofrecen perspectivas para la planificación de experimentos reales y contribuyen en la caracterización de los virus. Gracias a la creciente disponibilidad de datos experimentales y el poder de computación, las simulaciones de DM ofrecen un conocimiento más profundo de los mecanismos físicos que controlan el funcionamiento de los virus y permiten

desarrollar estrategias para combatirlos.

### Referencias

- [1] Aznar, M. y Reguera, D., Physical ingredients controlling stability and structural selection of empty viral capsids. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120[26], 6147-6159, 2016.
- [2] Buzón P., Maity S. y Roos W. H., Physical virology: From virus self-assembly to particle mechanics, Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 12(4):e1613, 2020.
- [3] Dimitrov D., Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications, *Nat Rev Microbiol.*, 2(2):109-22, 2004.
- [4] Hagan M. y Grason G., Equilibrium mechanisms of self-limiting assembly. *Rev Mod Phys.* 93(2):025008, 2021.
- [5] Luque A. y Reguera D., Theoretical Studies on Assembly, Physical Stability and Dynamics of Viruses, en *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook*, ed. por Mateu M. G., Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 553-595, 2013.
- [6] Mateu M. G., The Structural Basis of Virus Function, en *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook*, ed. por Mateu M. G., Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 3-51, 2013.
- [7] Mendoza, C. I. y Reguera, D., Shape selection and mis-assembly in viral capsid formation by elastic frustration. *Elife*, 9, e52525, 2020.
- [8] Mejía-Méndez, J. L., Vazquez-Duhalt, R., Hernández, L. R., Sánchez-Arreola,

E., y Bach, H., Virus-like particles: fundamentals and biomedical applications, International journal of molecular sciences, 23(15), 8579, 2022.

[9] Smith, K. M., Viruses, Cambridge University Press, 1963.

[10] Shirbaghaee, Z. y Bolhassani, A., Different applications of virus-like particles in biology and medicine: Vaccination and

delivery systems. Biopolymers, 105: 113-132, 2016.

[11] Vehkamäki, H, Classical Nucleation Theory in Multicomponent Systems, Springer Berlin, Heidelberg, 2006.

[12] Zandi R, van der Schoot P, Reguera D, Kegel W, Reiss H. Classical nucleation theory of virus capsids. Biophys J., 90[6], pp.1939-48, 2006.