



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Iztapalapa



**UNIVERSITAT DE
BARCELONA**

División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Posgrado en Ciencias (Física)

“Virología Física: Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales”

TESIS

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA)

PRESENTA

Fís. Jason Brandon Peña Muñoz

Matrícula: 2222800162

ORCID: 0000-0002-2250-7457

Correo: jason.penamunoz@gmail.com

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. David Reguera López (UB)

Dr. Leonardo Dagdug Lima (UAM-I)

JURADO:

Presidente:

Dr. Gustavo Adolfo Chapela Castaños (UAM-I)

Secretario:

Dr. Leonardo Dagdug Lima (UAM-I)

Vocal:

Dr. Carlos Ignacio Mendoza Ruiz (IIM-UNAM)

Iztapalapa, Ciudad de México a 29 de Octubre de 2024.

“The ultimate aim of the modern movement in biology is to explain all biology in terms of physics and chemistry.”

“El objetivo final del movimiento moderno en biología es explicar toda la biología en términos de física y química.”

Francis Crick

Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente a mis asesores, el Dr. David Reguera y el Dr. Leonardo Dagdug, por compartir su conocimiento y experiencia, y por su invaluable guía, apoyo y paciencia a lo largo de este proceso.

Especialmente, agradezco al Dr. David Reguera y a la Dra. M. del Carmen Miguel por su hospitalidad durante mi estancia de investigación en la Universidad de Barcelona y al Dr. Leonardo Dagdug por su constante apoyo en mi carrera científica desde la licenciatura.

Agradezco a mis padres, Juan Carlos Peña y Gabriela Muñoz, quienes siempre me han apoyado y alentado a continuar haciendo lo que me apasiona, y quienes me han enseñado a seguir adelante sin importar que tan grandes sean las dificultades u obstáculos de la vida. Gracias por enseñarme que el trabajo y esfuerzo constante siempre paga (aunque a veces tarde un poco) y por orientarme para convertirme en un ser humano íntegro.

De manera muy especial, quiero agradecer a Carla Train, una persona fundamental en mi vida. Gracias por apoyarme y por siempre creer en mí. Has sido mi mayor fuente de inspiración en la escritura, la música y la ciencia.

Aún nos quedan muchos kilómetros por recorrer juntos, Turi (literalmente...)

Finalmente, agradezco al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnología (CONAHCyT) y a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) por proporcionar los recursos económicos que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación.

Barcelona, España
Junio, 2024.

Jason Peña

Resumen

Los virus son agentes infecciosos y nanométricos, invisibles para el ojo humano. Estos entes biológicos en la frontera de la vida no tienen la capacidad de metabolizar o reproducirse por sí mismos, por lo cual, necesitan de un organismo hospedero para replicarse. Replicarse es su único objetivo, si es que se puede argumentar que tienen uno. Los virus, a pesar de ser relativamente muy simples en el ámbito biológico, han jugado un papel fundamental en la historia y desarrollo de prácticamente todos los reinos de la vida, desde bacterias hasta ecosistemas completos. Además de que se consideran importantes para la sociedad por causar enfermedades en plantas, animales y humanos que pueden ser mortales, constituyen un tema de gran interés en diversas ramas del conocimiento, que incluyen a la biología, la medicina y la salud pública. Las características sorprendentes y únicas de los virus, así como los intrincados procesos de su ciclo de replicación que ocurre dentro de una célula hospedera, han atraído la atención de la física y otras ciencias básicas, dando origen al campo de investigación que recibe el nombre de *virología física*.

En esta tesis, se desarrolla un marco teórico basado en la física estadística, la teoría de autoensamblaje en equilibrio y la Teoría Clásica de Nucleación (TCN) homogénea para desarrollar una teoría integral que se denomina Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales (TAECV). El objetivo principal de este trabajo de investigación es comprender con más profundidad uno de los pasos fundamentales del ciclo de replicación de muchos virus: el autoensamblaje de la cápside que protege el genoma viral a partir de subunidades proteicas o capsómeros.

La teoría resultante considera factores físicos y químicos importantes en el ciclo de replicación viral, como la concentración de subunidades proteicas o la temperatura. Los dos objetivos principales que consigue este trabajo son: (i) proporcionar una versión integral y fácilmente generalizable de la original Teoría Clásica de Nucleación de Cápsides Virales (TCNCV), y (ii) desarrollar tres modelos de Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV). Los tres modelos teóricos capturan, en orden creciente de complejidad, dos, tres y cuatro de las contribuciones energéticas más relevantes del proceso: la ventaja energética de agregación, la penalización asociada al borde de una cápside parcial, el costo de flexión por desviaciones de curvatura, y la energía de interacción entre un molde o un andamio esférico y subunidades proteicas.

En esta tesis, con el marco teórico desarrollado, la TAECV se utiliza para calcular propiedades fundamentales como el tamaño crítico de una cápside parcial que permite su crecimiento hasta una cápside completamente formada, la altura de la barrera de energía que debe superarse para el autoensamblaje y el ritmo de ensamblaje y desensamblaje de las cápsides virales. Adicionalmente, se proporciona información sobre las propiedades geométricas y mecánicas necesarias para que una cápside tenga el tamaño óptimo para encapsular el genoma viral y resistir condiciones ambientales extremas. Estos aspectos son sumamente importantes, ya que podrían alterar las vías de ensamblaje.

Al analizar los resultados que proporciona la TAECV, se obtienen conocimientos valiosos sobre los mecanismos de ensamblaje y desensamblaje de la cápside, que son fundamentales para una comprensión más profunda de los virus y el posible desarrollo de estrategias antivirales innovadoras. Se espera que estos modelos teóricos puedan llegar a generar ideas aplicables en el campo de la biotecnología, la salud pública y el tratamiento de enfermedades virales.

Palabras Clave: cápsides virales, autoensamblaje en equilibrio, virología física, teoría clásica de nucleación, teoría de autoensamblaje, cinética de autoensamblaje, replicación viral.

Índice

Resumen	IX
Índice	IX
Índice de Figuras	XI
Índice de Tablas	XXIII
Acrónimos	XXVI
1 Introducción	1
2 Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales	7
2.1 Introducción	7
2.2 Construcción Estadística del Ensamblaje de Cápsides Virales	8
2.2.1 Energía Libre del Ensamble	13
2.2.2 Ley de Acción de Masas y Energía Libre de Gibbs	15
2.3 Teoría Clásica de Nucleación de Cápsides Virales	16
2.3.1 Analogía Vapor-Líquido	17
2.3.2 Una Estimación Simple de la Energía de Borde	19
2.3.3 Energía libre de Autoensamblaje	20
2.3.4 La Barrera de Energía	21
2.4 Cinética del Autoensamblaje de Cápsides Virales	24
2.4.1 Cinética de Nucleación: Un análisis general	25
2.4.2 Cinética de Autoensamblaje de Cápsides Virales	27
2.4.3 Ritmo de Nucleación J en el Estado Estacionario	30
2.5 Desensamblaje de Cápsides Virales	33
2.5.1 La Barrera de Energía	33
2.5.2 Ritmo de Desensamblaje J_{des} en el Estado Estacionario	34
2.6 El Teorema de Nucleación	35
2.7 Conclusiones	37
3 Influencia de la Energía de Flexión en el Autoensamblaje de Cápsides Virales	39
3.1 Introducción	39
3.2 Autoensamblaje de una Cápside Viral Incorporando las Contribuciones Elásticas . .	41
3.2.1 Energía libre de Autoensamblaje	41
3.2.2 Modelado de la Energía de flexión	42
3.2.3 Autoensamblaje en representación (n, θ)	44
3.2.4 Autoensamblaje en la representación (n, R)	47

3.3	Paisaje de Energía Libre de Autoensamblaje en la representación (n, R)	48
3.3.1	Valores Preferenciales de Curvatura y Número de Agregación En Busca del Virus con el Tamaño Adecuado	53
3.3.2	Estabilidad de una Cápside de Tamaño Subóptimo	54
3.4	La Barrera de Energía	55
3.4.1	Desaparición del Punto Crítico	59
3.4.2	Casos Límite	60
3.5	Cinética del Autoensamblaje de Cápsides Virales con Energía de Flexión	62
3.5.1	Desacomplamiento de los Grados de Libertad n y R	68
3.5.2	Ritmo de Nucleación J en el Estado Estacionario	71
3.6	Desensamblaje de Cápsides Virales	76
3.7	Estimaciones para Cápsides Virales Reales	77
3.7.1	Propiedades Geométricas y Mecánicas	77
3.7.2	Aspectos Físicos del Autoensamblaje de la Cápside del VS40	78
3.7.3	Mecanismo de Compresión Continua para el Autoensamblaje de la Cápside del VS40	79
3.7.4	Cinética de Autoensamblaje del VS40	80
3.8	Conclusiones	81
3.9	El MFA Para Determinar Propiedades Mecánicas de Cápsides Virales	83
3.9.1	Una Estimación Simple del Módulo de Flexión	84
4	Autoensamblaje de Cápsides Virales sobre un Molde Esférico	85
4.1	Introducción	85
4.2	Modelo de la Interacción Andamiaje-Subunidad	87
4.3	Energía Libre de Autoensamblaje en (n, R)	89
4.3.1	AECV Tocando el Molde en un Punto	91
4.3.2	AECV en Contacto Puntual con el Molde: La Barrera de Energía y el Ritmo de Nucleación	92
4.4	Ensamblaje sobre el Molde Esférico	93
4.4.1	Régimen de Estabilidad de una Cápside en Presencia de un Molde Esférico	95
4.4.2	Efectos en la Barrera de Energía y el Tamaño Crítico de Nucleación	96
4.5	Cinética de Autoensamblaje y Ritmo de Nucleación en Presencia de un Molde Esférico	100
4.6	Sobre los Diagramas de Fase de Autoensamblaje de Cápsides Virales	102
4.7	Diagrama de Fase en términos del Estado Final de Autoensamblaje	103
4.8	Diagrama de Fase de Autoensamblaje en términos de la Cinética	105
4.9	Diagrama de Fase de Autoensamblaje con Dos Criterios Energéticos	107
4.10	Desviaciones Relativas de la Curvatura Preferencial	109
4.11	Conclusiones	111
5	Conclusiones y Observaciones Generales	113
6	Perspectivas: Futuras Líneas de Investigación	115
7	Lista de Publicaciones	117
	Referencias	127
	Índice Alfabético	132

Índice de Figuras

- Figura 2.1: 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 agregados que actúan como un 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 de 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. Durante todo el proceso, se asume que los agregados intermedios son casquetes esféricos de radio R . Este radio, en de la TCNCV, se mantiene constante hasta alcanzar la estructura final con n_{agr} subunidades. 9
- Figura 2.2: Representación esquemática del modelo continuo de una cápside esférica parcialmente formada. $l(n, \theta)$ representa la longitud del borde, R su radio y θ el ángulo que caracteriza el grado de completitud de la cápside. 18
- Figura 2.3: Gráficas representativas de la energía de borde y energía libre de Gibbs. La energía de borde $\tau_\lambda l(n)$ (panel izquierdo) se grafica para diferentes números de agregación n_{agr} , a saber, $n_{\text{agr}} = 60, 120$, y 180 , usando la estimación de la tensión lineal asociada a la energía de enlace por subunidad promedio $\Delta g \approx -15 k_B T$ (ver Ec. (2.66)). La energía de Gibbs $\Delta G(n)$ (panel derecho), dada por la ecuación Ec. (2.68), se traza para distintos valores de la diferencia de potencial químico, *i.e.*, $\Delta\mu = 0.0 k_B T$ (línea azul), $\Delta\mu = -0.5 k_B T$ (línea naranja), $\Delta\mu = -1.0 k_B T$ (línea verde), $\Delta\mu = -1.5 k_B T$ (línea roja), y, $\Delta\mu = -2.0 k_B T$ (línea morada), con $n_{\text{agr}} = 120$ y $\Delta g \approx -15 k_B T$ 21
- Figura 2.4: Representación gráfica del decaimiento de las Ecs. (2.72) (panel izquierdo) y (2.73) (panel derecho), en su versión adimensional, en función de la supersaturación, Γ 22
- Figura 2.5: Energía libre de Gibbs en dos condiciones de autoensamblaje y la relación entre altura de la barrera de energía y el tamaño crítico de agregación. En el panel izquierdo, se muestra la Ec. (2.68) en el estado de equilibrio, *i.e.*, $\Delta\mu = 0.0 k_B T$ (línea azul) y en el estado de supersaturación, *i.e.*, $\Delta\mu < 0$ (línea naranja). El trazo de esta función se obtiene al suponer que la cápside completa contiene $n_{\text{agr}} = 120$ subunidades y que la energía de enlace por subunidad promedio es $\Delta g \approx -15 k_B T$. En el panel derecho, se ilustra el comportamiento representativo del cociente en la Ec. (2.74) para una cápside con $n_{\text{agr}} = 120$ subunidades y distintos valores de la energía de enlace por subunidad promedio, *i.e.*, $\Delta g \approx -10 k_B T$ (línea azul), $\Delta g \approx -15 k_B T$ (línea naranja) y $\Delta g \approx -20 k_B T$ (línea verde), en función de la supersaturación, Γ 23

Figura 2.6: Flujo de subunidades de la especie k (círculos en color naranja) entre dos tamaños de agregados intermedios. El ritmo de unión y separación está dado por $\beta_{k\{n_j, n_k\}}(t)$ y $\gamma_{k\{n_j, n_k\}}(t)$, respectivamente. De lado izquierdo, se tiene un agregado de tamaño $\{n_j, n_k\}$, mientras que de lado derecho se representa un agregado de tamaño $\{n_j, n_k + 1\}$, que tiene una subunidad más (círculo en color naranja) de la especie k que el original (izquierda). El número de subunidades proteicas de la especie j ($j \neq k$), n_j , se mantiene constante (círculos tenues en color gris, azul y rojo). 26

Figura 2.7: Gráficas representativas de $\Delta G(n)$ (panel izquierdo) y $\exp[\beta\Delta G(n)]$ (panel derecho) en función del número de subunidades en un agregado n . Se emplearon los valores $\Delta\mu = -2.0 k_B T$, $n_{\text{agr}} = 120$ y $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ para la construcción de las curvas. 31

Figura 2.8: Ritmo de nucleación, J , y factor de Zeldovich, Z . En el panel izquierdo, se grafica el ritmo de nucleación, Ec. (2.118) (escalado por su valor mínimo, *i.e.*, $J_0 \equiv J_{\Gamma=0.0}$) en función de la supersaturación, Γ . En el panel derecho, se muestra el comportamiento del factor de Zeldovich, Ec. (2.117) al incrementar Γ . Las dos gráficas se obtuvieron con $n_{\text{agr}} = 180$, y para distintos valores de la energía de enlace efectiva Δg (ver Ec. (2.66)), *i.e.*, $\Delta g \approx -5.0 k_B T$ (línea azul), $\Delta g \approx -10.0 k_B T$ (línea naranja) y $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ (línea verde), $\Delta g \approx -20.0 k_B T$ (línea roja), y $\Delta g \approx -25.0 k_B T$ (línea morada). 33

Figura 2.9: Representación gráfica del comportamiento de las Ecs. (2.122) (panel izquierdo) y (2.125) (panel derecho), en su versión adimensional, en función de la supersaturación Γ . Las curvas de J_{des}/J_0 se obtuvieron con $n_{\text{agr}} = 180$, y para distintos valores de la energía de enlace efectiva Δg (ver Ec. (2.66)), *i.e.*, $\Delta g \approx -5.0 k_B T$ (línea azul), $\Delta g \approx -10.0 k_B T$ (línea naranja) y $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ (línea verde), $\Delta g \approx -20.0 k_B T$ (línea roja), y $\Delta g \approx -25.0 k_B T$ (línea morada). 35

Figura 3.1: Representación esquemática del autoensamblaje de una cápside viral con energía de flexión. El proceso de autoensamblaje se despliega de izquierda a derecha. Inicialmente, las subunidades libres comienzan a asociarse formando agregados que, al alcanzar un tamaño crítico n^* , actúan como un embrión o núcleo de la cápside, el cual crece hasta formar una cubierta proteica cerrada. Durante este proceso, la competencia entre la energía de unión, $n\Delta\mu$, la energía de borde, $\tau_\lambda l(n, \theta, R)$, y la energía de flexión, G_{flex} , hace que la cápside se cierre prematuramente con $n < n_T$ y, por lo tanto, para $R < R_T$. Al culminar, la cápside completa consta de n_c subunidades y tiene un radio R_c . 43

- Figura 3.2: Paisaje de energía libre escalada del modelo de AECV con energía de flexión, Ec. (3.10), en función del número instantáneo de subunidades escalado, n/n_T , y el ángulo de completitud, θ , para un valor de la *pseudo supersaturación* de $\Upsilon = -2.0$ y dos valores diferentes de la tensión lineal escalada de la cápside, *i.e.*, $\tilde{t} = 0.01$ y 0.50 . En esta representación, los valores bajos de energía escalada aparecen en color morado, mientras que los valores altos se muestran en color rojo. La línea blanca discontinua representa la «trayectoria» de una cápside que se forma siguiendo la curvatura preferencial, $R = R_T$. A su vez, la línea verde muestra la TME, indicando cómo se autoensamblaría una cápside bajo el efecto de competición entre la energía de borde y la energía de flexión. Finalmente, la línea cyan discontinua muestra el comportamiento de la cápside después de alcanzar n_c subunidades. 46
- Figura 3.3: Representación esquemática de la superficie de energía escalada del modelo de AECV, que incorpora la energía de flexión según la Ec. (3.21), para los parámetros $\Gamma = 0.4$ y $\tilde{f}_r = 5.0$ (panel superior). En el panel inferior, se ofrece un resumen gráfico del proceso de autoensamblaje, en donde se destacan los puntos clave de dicho proceso. 49
- Figura 3.4: Paisaje de energía escalada de AECV con energía de flexión, Ec. (3.21), en función del número instantáneo de subunidades escalado, n/n_T , y del radio instantáneo de curvatura escalado, R/R_T , para diferentes valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$, manteniendo la supersaturación fija, *i.e.*, $\Gamma = 0.4$. En esta representación, los valores bajos de energía aparecen en color morado, mientras que los valores altos se muestran en color rojo. La línea blanca discontinua representa la «trayectoria» de una cápside que se forma siguiendo la curvatura preferencial $R = R_T$. El paisaje de energía termina en la línea negra discontinua que corresponde a la condición de cierre $R_r = \sqrt{n_r}$ 51
- Figura 3.5: Número y radio de cierre escalados, Ecs. (3.24) y (3.25), respectivamente, en función de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$. En el panel izquierdo, se presenta la relación entre el número de subunidades con las cuales se cierra la cápside, n_c , y el número de agregación preferencial, n_T . En el panel derecho, se muestra el radio escalado al que se cierra la cápside, $R_{rc} = R_c/R_T$, a medida que $\tilde{f}_r$ aumenta. Esta figura ilustra la tendencia a ensamblar cápsides con radios más pequeños en comparación con la curvatura preferencial, R_T . La combinación de λ_T y κ influye en el AECV, lo que resulta en parámetros de cierre más pequeños de los previstos o nativos (véase en Table 3.1 de la Sección 3.9.1). El radio de curvatura preferencial, R_T y el número de agregación preferencial, n_T , se representan con una línea negra discontinua. 52

Figura 3.6: Curvas representativas de la evolución del radio de una cápside en formación en función del número escalado de subunidades, n_r , para distintos valores de la constante de flexión, *i.e.*, $\tilde{f}_r = 2.0$ (línea azul), $\tilde{f}_r = 5.0$ (línea naranja), $\tilde{f}_r = 10.0$ (línea verde), $\tilde{f}_r = 100.0$ (línea roja). Este último valor de $\tilde{f}_r$ corresponde al caso dominado por la energía de flexión, es decir, cuando $\kappa \gg \lambda_T$ (véase la Ec. (3.20)). En ambos paneles, se puede observar que, a medida que la constante de flexión aumenta, y por lo tanto la rigidez de la cápside se incrementa, el radio instantáneo del agregado tiende a R_T . Para valores pequeños de κ , el efecto de la energía de borde provoca una compresión que se traduce en la disminución del radio instantáneo de curvatura, o de forma equivalente de R_r , a medida que n_r aumenta. En el panel de la derecha se representa la localización del máximo local de energía que toma valores de R mayores a medida que la constante de flexión disminuye. 52

Figura 3.7: Régimen de estabilidad de cápsides virales cerradas. En verde se muestra la región de cápsides estables y en rojo la región de cápsides metaestables. En la región estable, cualquier combinación de los parámetros Γ y $\tilde{f}_r$ garantiza la formación de una cápside que, aunque de tamaño subóptimo, tendrá una energía libre (escalada) menor a cero. Por otro lado, la elección de una combinación de parámetros de la región en color rojo producirá una cápside metaestable que es energéticamente menos favorable que tener las subunidades en solución y es susceptible a desensamblarse. La línea azul representa la frontera de estabilidad, determinada por la Ec. (3.28). 55

Figura 3.8: Tamaño crítico y radio crítico escalados, Ec. (3.32), en función de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$, para diferentes valores de la supersaturación, Γ . En el panel izquierdo, se muestra el radio crítico escalado, R_r^* , mientras que en el panel derecho se presenta el comportamiento de n_r^* . Se puede observar que el radio de curvatura crítico, R^* , tiende a su valor preferencial, *i.e.*, R_T , a la vez que el número crítico de subunidades, n^* , tiende a $n_T/2$, a medida que $\tilde{f}_r$ aumenta. Para la generación de los dos gráficos se utilizaron los siguientes valores de la supersaturación: $\Gamma = 0.0$ (línea azul), $\Gamma = 0.3$ (línea naranja), $\Gamma = 0.5$ (línea verde), $\Gamma = 1.0$ (línea roja). El radio de curvatura preferencial, R_T , y el número $n_T/2$, se representan con una línea negra discontinua. 56

Figura 3.9: Tamaño crítico y radio crítico escalados, Ec. (3.32), en función de la supersaturación, Γ , para distintos valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$. En el panel izquierdo, se encuentra el comportamiento del radio crítico escalado, R^*/R_T . Puede observarse que tiende hacia la curvatura preferencial (al caso dominado por la flexión, *i.e.*, al caso clásico representado por la línea negra discontinua) para valores grandes de $\tilde{f}_r$. En el panel derecho, se presenta el número crítico de subunidades y se observa cómo se recupera el resultado clásico a medida que $\tilde{f}_r \rightarrow \infty$. Las dos gráficas se generaron con los siguientes valores de la constante de flexión: $\tilde{f}_r = 0.5$ (línea azul), $\tilde{f}_r = 1.0$ (línea naranja), $\tilde{f}_r = 2.0$ (línea verde), $\tilde{f}_r = 5.0$ (línea roja) y $\tilde{f}_r = 10.0$ (línea morada). 57

Figura 3.10: Energía escalada de autoensamblaje, Ec. (3.21), evaluada en dos diferentes radios de curvatura, *i.e.*, $R_r = 1, R_r^{\text{TME}}$, para una cápside con $n_T = 120$. En el panel izquierdo, se muestra el comportamiento de la energía escalada de una cápside que crecen con un radio de curvatura fijo igual al radio preferencial, R_T , mientras que en el panel derecho se presentan las curvas representativas de $\Delta\mathcal{E}(n_r, R_r^{\text{TME}})$, es decir, la energía de autoensamblaje evaluada en el radio escalado que define la TME, R_r^{TME} , es decir, en la solución de la Ec. 3.23. Estas funciones se grafican en función del *número de subunidades escalado*, n/n_T , para diferentes valores de la supersaturación (véase la Ec. (3.113)): $\Gamma = 0.0$ (línea azul), $\Gamma = 0.3$ (línea naranja), $\Gamma = 0.5$ (línea verde) y $\Gamma = 1.0$ (línea roja). Particularmente se ha utilizado $\tilde{f}_r = 20$ para las curvas del panel derecho. En ambos casos, la altura de la barrera de energía en el caso clásico y en ausencia de potencial químico se representa mediante una línea negra discontinua. 57

Figura 3.11: El panel izquierdo muestra la representación gráfica de la altura de la barrera de energía escalada del AECV con energía de flexión, Ec. (3.34), en función de la supersaturación, Γ , para diferentes valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$, a saber, $\tilde{f}_r = 0.5$ (línea azul), $\tilde{f}_r = 1.0$ (línea naranja), $\tilde{f}_r = 2.0$ (línea verde) y $\tilde{f}_r = 5.0$ (línea roja). La curva que describe la altura de la barrera de energía del caso clásico, en su versión adimensional (dividida por $\lambda_T n_{\text{agr}}$), se representa como una línea negra discontinua. El panel derecho presenta la diferencia entre las barreras de energía del AECV del modelo clásico, Ec. (2.73) (dividida por el producto $\lambda_T n_{\text{agr}}$), y del sistema con energía de flexión, Ec. (3.34), *i.e.*, $\Delta G^*/\lambda_T n_{\text{agr}} - \Delta\mathcal{E}^*$, en función de $\tilde{f}_r$ para diferentes valores de Γ : $\Gamma = 0.0$ (línea azul), $\Gamma = 0.3$ (línea naranja), $\Gamma = 0.5$ (línea verde) y $\Gamma = 1.0$ (línea roja). 58

Figura 3.12: Paisaje de energía escalada del modelo de AECV con energía de flexión, Ec. (3.21), en función del número escalado de subunidades, n/n_T , y de el cociente R/R_T para $\Gamma = 0.0$ y valores pequeños de la constante de flexión $\tilde{f}_r$. El código de color y el significado de las líneas sobre la superficie de energía coinciden con lo descrito en la Figura 3.4. 60

Figura 3.13: Representación esquemática del número crítico de subunidades, n_r^* (panel izquierdo), y la altura de la barrera de energía escalada, $\Delta\mathcal{E}^*$ (panel derecho), en el estado de equilibrio, *i.e.*, con $\Delta\mu = 0.0 k_B T$ ($\Gamma = 0.0$) (línea azul) y en el estado supersaturado, es decir, $\Delta\mu < 0.0 k_B T$ (en donde a manera de ejemplo se utilizó $\Gamma = 2.0$) (línea naranja), en función de $\tilde{f}_r$. En ambos casos, los resultados obtenidos en el modelo clásico con $\Gamma = 0.0$, Ecs. (2.75) y (2.76), respectivamente, se representan con una línea negra discontinua. 61

Figura 3.14: Representación esquemática del aumento y disminución discreta del radio de curvatura de un agregado de tamaño $\{n, R\}$. En naranja, se muestra un agregado intermediario con radio R , en azul, uno con radio $R - \delta R$ y en verde, uno con radio $R + \delta R$ 63

Figura 3.15: Representación esquemática del flujo de tamaños de agregados en la dirección de n (horizontal) y R (vertical). Por un lado, el ritmo de unión y separación de subunidades proteicas está dado por $\beta_{n\{n,R\}}(t)$ y $\gamma_{n\{n,R\}}(t)$, respectivamente. Por otro lado, $\beta_{h\{n,R\}}(t)$ y $\gamma_{h\{n,R\}}(t)$ representan los ritmos de crecimiento y disminución del radio de curvatura. En el centro de la figura se observa un agregado de tamaño $\{n, R\}$. A la derecha (izquierda) de este, se representa a un agregado de tamaño $\{n+1, R\}$ ($\{n-1, R\}$), que tiene una subunidad más (menos). En la dirección vertical, se puede observar que por arriba (abajo) del agregado central, se encuentra una cápside parcialmente formada con un radio mayor (menor) comparado con el de la estructura principal. Figura basada en [107]. 64

Figura 3.16: Curvas representativas del ritmo de nucleación de autoensamblaje (panel izquierdo), $J_{\beta_R^* \gg \beta_n^*}/c_s \beta_n^*$, y desensamblaje (panel derecho), $|J_{\text{des}, \beta_R^* \gg \beta_n^*}|/c_s \beta_n^*$, en el estado estacionario como función de la supersaturación Γ para diferentes valores de la constante de flexión $\tilde{f}_r$. Para generar los dos gráficos se utilizó $n_T = 120$, $R_T = 10$ nm $\Delta g \approx -5.0 k_B T$ y un conjunto de valores de $\tilde{f}_r$: $\tilde{f}_r = 0.50$ (línea azul), $\tilde{f}_r = 1.00$ (línea naranja), $\tilde{f}_r = 5.00$ (línea verde) y $\tilde{f}_r = 10.00$ (línea roja). La línea negra discontinua describe el comportamiento del ritmo de nucleación en el modelo clásico (ver Ec. (2.118) para autoensamblaje y Ec. (2.125) para desensamblaje). 75

Figura 3.17: Comportamiento de la altura de la barrera de nucleación, ΔG^* , y número crítico de subunidades, n^* , de una cápside vacía del VS40 en función de la supersaturación, Γ . En el panel izquierdo, se muestra una disminución considerable en la altura de la barrera de energía cuando se toma en cuenta la energía de flexión (Ec. (3.34), línea azul) en comparación con el modelo clásico (Ec. (2.73), línea negra discontinua). El panel derecho refleja que el número de capsómeros que componen el núcleo de la cápside (Ec. (3.32), línea azul) es menor que en un sistema que siempre sigue el radio de curvatura preferencial (Ec. (2.72), línea negra discontinua). Para generar los dos gráficos, se utilizó $n_T = 72$, $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ y $\kappa = 175 k_B T$, resultando en una constante de flexión de $\tilde{f}_r = 5.50$ 79

Figura 3.18: Curvas representativas del ritmo de nucleación de autoensamblaje (panel izquierdo), $J_{\beta_R^* \gg \beta_n^*}/c_s \beta_n^*$, y desensamblaje (panel derecho), $|J_{\text{des}, \beta_R^* \gg \beta_n^*}|/c_s \beta_n^*$, en el estado estacionario para una cápside del VS40 como función de la supersaturación, Γ . Para generar los dos gráficos, se utilizó $n_T = 72$, $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ y $\kappa = 175 k_B T$. En ambos casos, el ritmo de ensamblaje y desensamblaje en el modelo clásico se representa con una línea negra discontinua. 80

Figura 3.19: Gráfica del cociente de los ritmos de nucleación en el estado estacionario, es decir, $J_{\beta_R^* \gg \beta_n^*}/J_{\text{clásico}} \sim \exp(-\beta \Delta G^*)/\exp(-\beta \Delta G_{\text{clásico}}^*)$, en función de la supersaturación, Γ . En este gráfico se puede observar la convergencia del ritmo de autoensamblaje con energía de flexión, Ec. (3.108), al resultado del caso clásico, Ec. (2.118) para valores grandes de la supersaturación. Para generar los dos gráficos, se utilizó $n_T = 72$, $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ y $\kappa = 175 k_B T$ 80

Figura 3.20: Representación esquemática de la configuración experimental de nanoindentación de virus con un MFA. La muestra (depositada sobre un portaobjetos porta-objetos) o el *cantilever* se monta sobre un *piezo-scanner* para desplazarse en todas las direcciones. La punta del MFA es localizada en el centro del virus, y se utiliza para aplicar una fuerza sobre el virus. Esta fuerza deforma al virus y dobla el cantilever, lo cual se registra en el *fotodiodo de cuadrante*. La señal de fotodiodo es una medida de la fuerza aplicada en la muestra y a partir de ella se puede generar una *gráfica fuerza-indentación* en donde se identifica (i) el régimen de indentación reversible e irreversible (ii) la indentación o deformación relativa y (iii) la fuerza necesaria para romper el virus. Figura adaptada de [99, 136] (panel izquierdo: diagrama de nanoindentación de virus con MFA) y [25] (panel derecho: gráfica genérica de fuerza-indentación). 83

Figura 4.1: Representación esquemática del autoensamblaje de una cápside viral con energía de flexión en presencia de un molde esférico cuando $R \neq R_m \neq R_T$. El proceso de autoensamblaje se despliega de izquierda a derecha: Inicialmente, las subunidades libres comienzan a asociarse formando agregados que actúan como un embrión o núcleo de la cápside, el cual crece hasta formar una cubierta proteica cerrada. Durante este proceso, la competencia entre la energía de unión, $n\Delta\mu$, la energía de adsorción debida al molde, G_{molde} , la energía de borde., $\tau_\lambda l(n, \theta, R)$, y la energía de flexión, G_{flex} , impulsa el autoensamblaje para $n < n_T$ y, por lo tanto, para $R < R_T$. Al culminar, la cápside completa consta de n_c subunidades y tiene un radio R_c 88

Figura 4.2: Representación esquemática del autoensamblaje de una cápside viral sobre un molde esférico. En el panel izquierdo, se muestra una cápside parcial y una cápside cerrada cuando $R_m < R_T$, mientras que en el panel derecho se muestran estos dos estados cuando $R_m > R_T$ 90

Figura 4.3: Comparación del régimen de estabilidad de cápsides virales cerradas que se han autoensamblado sin un molde esférico preformado o en contacto con él únicamente en una subunidad (ver Fig. 4.1). En verde se muestra la región de cápsides estables, mientras que en rojo se representa la región de cápsides metaestables. Dentro de la región estable, cualquier combinación de los parámetros Γ y $\tilde{f}_r$ asegura la formación de una cápside que, aunque de tamaño subóptimo, tiene una energía libre (escalada) menor a cero. Por otro lado, la elección de una combinación de parámetros en la región roja conduce a una cápside metaestable. La línea azul representa la frontera de estabilidad del AECV sin molde, determinada por la Ec. (3.28), mientras que la línea naranja es la frontera de estabilidad cuando $\gamma_m = 0.1$ (ver Ec. (4.8)). La región amarilla muestra la ampliación del dominio de valores $(\Gamma, \tilde{f}_r)$ que forman cápsides estables debido al contacto con el molde en una subunidad. Se observa que la ampliación de la región estable debida al molde disminuye conforme $\tilde{f}_r$ aumenta. 92

Figura 4.4: Paisaje de energía generado por la Ec. (4.10) en función de $n_r = n/n_T$ para diferentes valores de γ_m (panel izquierdo) y R_{rm} (panel derecho). En el panel izquierdo, se estableció $R_{rm} = 0.95$ y se usaron los siguientes valores de γ_m : $\gamma_m = 1.0$ (línea azul), $\gamma_m = 1.2$ (línea naranja), $\gamma_m = 1.3$ (línea verde), y $\gamma_m = 1.5$ (línea roja). El panel derecho tiene asociado $\gamma_m = 1.2$ y el conjunto de valores subsiguiente de R_{rm} : $R_{rm} = 0.60$ (línea azul), $R_{rm} = 0.70$ (línea naranja), $R_{rm} = 0.80$ (línea verde) y $R_{rm} = 1.00$ (línea roja). Se utilizaron $\Gamma = 1.0$ y $\tilde{f}_r = 5.0$ como valores de supersaturación y constante de flexión para generar las gráficas. En ambos casos, la línea negra discontinua representa el paisaje de energía en equilibrio, *i.e.*, $\Gamma = 0.0$ y con $R_{rm} = 1$, sirviendo como referencia para comprender el efecto del radio del molde en la interacción molde-subunidad. 94

Figura 4.5: Gráficas representativas del paisaje de energía libre escalada, Ec. (4.10), y el efecto que implica ensamblarse sobre un molde con $R_m < R_T$ o $R_m > R_T$, en función del número de subunidades instantáneo escalado, n/n_T . En el gráfico se presentan tres condiciones de autoensamblaje: (i) autoensamblaje en el estado de equilibrio, *i.e.*, con $\Gamma = 0.0$ ($\Delta\mu = 0.0, k_B T$) (línea negra discontinua), (ii) autoensamblaje con $R_m = 0.6R_T$ (línea azul) y (iii) autoensamblaje con $R_m = 1.4R_T$ (línea naranja). La estructura de estas curvas se establece considerando que $\Gamma = 1.0$, $\gamma_m = 1.2$ y $\tilde{f}_r = 5.0$. El inicio y final del autoensamblaje se representan con un punto en color amarillo y rojo, respectivamente. 94

Figura 4.6: Régimen de estabilidad de cápsides virales cerradas que se han autoensamblado sobre un molde esférico. La región verde muestra cápsides estables, mientras que la región roja representa cápsides metaestables. Dentro de la región estable, cualquier combinación de los parámetros Γ y $\tilde{f}_r$ garantiza la formación de una cápside con energía libre (escalada) menor a cero. Por otro lado, la elección de una combinación de parámetros en la región roja puede llevar a una cápside metaestable. La línea azul en el diagrama representa la frontera de estabilidad, determinada por la Ec. (4.13). Los valores utilizados para generar el diagrama de estabilidad fueron $R_{rm} = 0.85$ y $\gamma_m = 1.2$ 96

Figura 4.7: Tamaño crítico escalado y altura de la barrera de energía escalada en función de la supersaturación, Γ , para distintos valores del factor de escalamiento, γ_m . En el panel izquierdo, se representa la variación del tamaño crítico relativo a n_T , Ec. (4.16). En el panel derecho, se encuentra el comportamiento de $\Delta\mathcal{E}^*$ según la Ec. (4.17). Las curvas en color se generaron con los siguientes valores $\tilde{f}_r = 5.0$ y $R_{rm} = 0.85$, en donde $\gamma_m = 1.2$ (línea azul), $\gamma_m = 1.5$ (línea naranja), $\gamma_m = 2.0$ (línea verde) y $\gamma_m = 5.0$ (línea roja). En ambos paneles se representa el comportamiento de las cantidades correspondientes en el «modelo clásico» (línea negra discontinua) y en el modelo de AECV con energía de flexión (línea gris discontinua). 97

- Figura 4.8: Tamaño crítico escalado y altura de la barrera de energía escalada en función del radio del molde escalado, $R_{rm} = R_m/R_T$, para distintos valores del factor de escalamiento, γ_m . En el panel izquierdo, se representa la variación del tamaño crítico del núcleo relativo a n_T , Ec. (4.16). En el panel derecho, se encuentra el comportamiento de $\Delta\mathcal{E}^*$ según la Ec. (4.17). Las curvas en color se generaron con los siguientes valores: $\Gamma = 1.0$ y $\tilde{f}_r = 5.0$, en donde $\gamma_m = 1.2$ (línea azul), $\gamma_m = 1.5$ (línea naranja), $\gamma_m = 2.0$ (línea verde) y $\gamma_m = 5.0$ (línea roja). En ambos paneles se representa el comportamiento de las cantidades cuando $\Gamma = 0.0$ a la vez que $\tilde{f}_r = 0.0$, que marca el límite de estabilidad de las cápsides cerradas (línea negra discontinua). 98

- Figura 4.9: Tamaño crítico escalado y altura de la barrera de energía escalada en función $R_{rm} = R_m/R_T$, para distintos valores del factor de escalamiento, γ_m , en el caso dominado por la energía de flexión, *i.e.*, $\tilde{f}_r \rightarrow \infty$. En el panel izquierdo, se representa la variación del tamaño crítico del núcleo relativo a n_T , Ec. (4.16). En el panel derecho, se muestra el comportamiento de $\Delta\mathcal{E}^*$ de acuerdo con la Ec. (4.17). Las curvas en color se generaron con los siguientes valores $\Gamma = 1.0$ y $\tilde{f}_r = 1000$, en donde $\gamma_m = 1.2$ (línea azul), $\gamma_m = 1.5$ (línea naranja), $\gamma_m = 2.0$ (línea verde) y $\gamma_m = 5.0$ (línea roja). En ambos paneles se representa el comportamiento de las cantidades cuando $\Gamma = 0.0$ 99

- Figura 4.10: Régimen de estabilidad de cápsides virales cerradas que se ensamblan sobre un molde esférico. En verde se muestra la región de cápsides estables y en roja la región de cápsides metaestables. Dentro de la región estable, cualquier combinación de los parámetros Γ y $\tilde{f}_r$ garantiza la formación de una cápside que tendrá una energía libre (escalada) menor a cero. Por otro lado, la elección de una combinación de parámetros de la región en color roja producirá una cápside metaestable. Adicionalmente, la línea azul representa la frontera de estabilidad, determinada por la Ec. (4.13). Los valores utilizados para generar el diagrama de estabilidad fueron $\tilde{f}_r = 5.0$ y $\gamma_m = 1.2$. Con un punto en color rojo se señala el valor de R_{rm} que separa los regímenes estable y metaestable cuando $\Gamma = 1.0$, en este caso $R_{rm} \approx 0.67$, por lo que la estabilidad se consigue para $R_{rm} > 0.67$ en este caso. 99

Figura 4.11: Ritmo de autoensamblaje en el estado estacionario.[†] En el panel izquierdo, se grafica el ritmo de nucleación, Ec. (2.113) (escalado por J_0 , siendo J_0 el ritmo de nucleación evaluado en $\Gamma = 0.0$ $R_{rm} = 1.0$) en función de la supersaturación, Γ , en donde se estableció que $R_{rm} = 0.95$ para fijar el valor del costo de energía de flexión. En esta gráfica, se representa la solución del modelo clásico del Capítulo 2 con una línea negra discontinua. En el panel derecho, se grafica el cociente J/J_0 en función de R_{rm} , usando $\Gamma = 1.0$. Los puntos en color rojo indican la frontera de estabilidad en el eje de las abscisas, por lo que la sección de las curvas a color que se encuentren a la izquierda de los puntos en color rojo generan cápsides metaestables (líneas discontinuas) y la sección a la derecha de estos puntos muestran la región estable (líneas continuas). En ambas gráficas, los valores utilizados para generar las curvas fueron $\tilde{f}_r = 5.0$, $n_c = 180$ *, $\Delta g \approx -5k_B T$. y una serie de valores para γ_m : $\gamma_m = 1.2$ (línea azul), $\gamma_m = 1.5$ (línea naranja), $\gamma_m = 2.0$ (línea verde) y $\gamma_m = 5.0$ (línea roja). [†] Con el fin de dar una representación e interpretación adecuada del ritmo de autoensamblaje, las gráficas generadas para esta figura se obtuvieron utilizando la energía libre de Gibbs, ΔG , y el tamaño crítico, n^* , en su versión *dimensional* en vez de sus versiones adimensionales que son la energía libre escalada, Ec. (4.2) y el cociente n^*/n_T de la Ec. (4.16). Las versiones dimensionales se obtienen a través de las siguientes relaciones: $n^* = n_r^* n_T$ y $\Delta G^* = \lambda_T n_T \Delta \mathcal{E}^*$, respectivamente, lo que justifica la necesidad de escribir λ_T de forma explícita (ver Ec. (3.19)) y, por lo tanto, proporcionar una aproximación de la energía de enlace efectiva por subunidad Δg y el número de subunidades en una cápside completamente formada que sigue la curvatura preferencial R_T , *i.e.*, n_T . La discusión de los casos en los que es conveniente utilizar las cantidades escaladas y cuando no se encuentra en el pie de página de la página 75. *Es importante no confundir el número de cierre, n_c , con el *número de agregación preferencial*, n_T . El número de cierre se determina por completo al fijar R_{rm} y no es necesario indicarlo explícitamente, mientras que n_T influye en la estimación de λ_T y proporciona información sobre la curvatura preferencial. 101

Figura 4.12: Diagrama de fase del agua y diagrama de autoensamblaje cápsides virales. En el panel izquierdo, se presenta una versión simplificada del diagrama de fase temperatura-presión del agua, en donde los estados sólido, líquido y gaseoso del agua se muestran como función de la presión, p , y la temperatura, T . Las líneas continuas representan la coexistencia de distintas fases en el equilibrio (equilibrio en términos del potencial químico entre las fases α y β , *i.e.*, $\mu_\alpha = \mu_\beta$). Adicionalmente se identifican dos puntos singulares: (i) el *punto triple*, que ocurre a $T = 0.01^\circ\text{C}$ y $p = 0.008 \text{ atm}$, y en donde las tres fases coexisten y (ii) el *punto crítico* con coordenadas ($T = 378^\circ\text{C}$, $p = 218 \text{ atm}$), que señala el término de la coexistencia líquido-vapor. En el panel derecho, se muestra uno de los diagramas de fase de autoensamblaje generados por C. Mendoza y D. Reguera (figura adaptada de [43]) en el caso dominado por la energía de flexión, *i.e.*, $\gamma_{\text{Fvk}} = 0.0$ ($\tilde{f}_r \rightarrow \infty$): Las diferentes fases indican cuál es la estructura con la energía libre más baja en términos sus parámetros λ y $\Delta\tilde{\mu}$. En color naranja se destacan los cinturones como estructuras más estables, en rojo las cápsides frustradas con defectos, en verde los cascarones cerrados sin defectos, y en morado los cilindros. Además, se muestra en azul una región correspondiente a casquetes esféricos metaestables sin defectos, mientras que la región blanca representa subunidades proteicas libres en solución. 102

Figura 4.13: Diagrama de fase de autoensamblaje determinado por el criterio energético de la energía libre escalada de cierre. En este diagrama se muestran dos regiones que se categorizan según el valor relativo de la energía libre escalada de cierre, es decir, a través de las desigualdades $\Delta\mathcal{E}_{cm} > \Delta\mathcal{E}_c$ (región azul) y $\Delta\mathcal{E}_{cm} < \Delta\mathcal{E}_c$ (región verde). Los diagramas de fase fueron obtenidos con un valor fijo de la supersaturación, *i.e.*, $\Gamma = 1.0$ y para distintos valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$: $\tilde{f}_r = 0.5$ (cuadrante (i)), $\tilde{f}_r = 5.0$ (cuadrante (ii)), $\tilde{f}_r = 10.0$ (cuadrante (iii)) y $\tilde{f}_r = 100.0$ (cuadrante (iv)). 104

Figura 4.14: Diagrama de fase de autoensamblaje determinado por el criterio energético de la altura de la barrera de energía escalada. Las dos fases se categorizan según los siguientes escenarios: si $\Delta\mathcal{E}_m^* > \Delta\mathcal{E}^*$ (región azul) y $\Delta\mathcal{E}_m^* < \Delta\mathcal{E}^*$ (región verde). Los diagramas de fase fueron obtenidos con un valor fijo de la supersaturación, *i.e.*, $\Gamma = 1.0$, y para distintos valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$: $\tilde{f}_r = 0.5$ (cuadrante (i)), $\tilde{f}_r = 5.0$ (cuadrante (ii)), $\tilde{f}_r = 10.0$ (cuadrante (iii)) y $\tilde{f}_r = 100.0$ (cuadrante (iv)). 106

Figura 4.15: Diagrama de fase de autoensamblaje determinado mediante el criterio energético de la altura de la barrera de energía en combinación con el criterio de la energía libre escalada de cierre en función de R_{rm} y γ_m . Este diagrama exhibe cinco regiones de autoensamblaje clasificadas según el valor relativo de la altura de la barrera de energía y la energía libre escalada de cierre. Los diagramas de fase de los primeros cuatro cuadrantes fueron obtenidos con un valor fijo de la supersaturación, *i.e.*, $\Gamma = 1.0$ y para los siguientes valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$: $\tilde{f}_r = 0.1$ (cuadrante (i)), $\tilde{f}_r = 0.5$ (cuadrante (ii)), $\tilde{f}_r = 10.0$ (cuadrante (iii)) y $\tilde{f}_r = 100.0$ (cuadrante (iv)). Los diagramas de fase de los cuadrantes (v) y (vi) fueron obtenidos con $\Gamma = 3.0$ y $\tilde{f}_r = 5.0$ y $\Gamma = 8.0$ y $\tilde{f}_r = 10.0$, respectivamente. Las cinco fases de este diagrama se clasifican según el código cromático presentado en el Tabla 4.1. 108

Figura 4.16: Gráficas representativas de la altura de la barrera de energía y la energía en el estado final de autoensamblaje en función de la desviación relativa, δ_R . Las curvas del panel izquierdo se obtienen con la Ec. (4.17), mientras que las del panel derecho se obtienen con la Ec. (4.12). Ambas gráficas se generaron utilizando los parámetros $\Gamma = 1.0$, $\tilde{f}_r = 5.0$, y $\gamma_m = 1.2$. Con las curvas azules, se representan los valores de $\Delta\mathcal{E}^*$ (panel izquierdo) y $\Delta\mathcal{E}_c$ (panel derecho) para desviaciones de curvatura hacia radios menores en comparación con R_T , mientras que las líneas naranjas representan los valores de la barrera de energía escalada (panel izquierdo) y la energía libre escalada de cierre (panel derecho) cuando el radio del molde es $R_m = R_T(1 + \delta_R)$. La sección discontinua representa la formación de cápsides metaestables, mientras que la sección continua de las curvas a color indica que se formará una cápside estable. 109

Figura 4.17: Gráficas representativas del tamaño del núcleo crítico escalado, n_r^* , y el cociente J/J_0 en función de la desviación relativa del radio de flexión, δ_R . Las curvas del panel izquierdo se obtienen con la Ec. (4.16), mientras que las del panel derecho se obtienen con la Ec. (2.113). Ambas gráficas se generaron utilizando los parámetros $\Gamma = 1.0$, $\tilde{f}_r = 5.0$, $\gamma_m = 1.2$, $n_T = 180$, y $\Delta g \approx -5, k_B T$. Con las curvas azules, se representan los valores de n_r^* (panel izquierdo) y J/J_0 (panel derecho) para desviaciones de curvatura hacia radios menores en comparación con R_T , mientras que las líneas naranjas representan los valores del tamaño del núcleo crítico (panel izquierdo) y el cociente J/J_0 (panel derecho) cuando el radio del molde se desvía del de curvatura preferencial por un factor $R_T\delta_R$. La sección discontinua representa la formación de cápsides metaestables, mientras que la sección continua de las curvas a color indica que se formará una cápside estable. 110

Índice de Tablas

Tabla 3.1:	Propiedades geométricas y mecánicas de las cápsides del Virus de la Hepatitis B (VHB) [†] , Virus del Moteado Clorótico del Caupí (VMCC), Virus Diminuto de Ratón (VDR), VS40, Virus de Leucemia Murina (VLM) [‡] e Iridovirus de Wiseana (IVW). El espesor de las cápsides que no están referenciadas se extrajo de [25], mientras que el módulo de flexión, κ , se calculó usando la Ec. (3.117), con $\nu_p = 0.4$ y $T = 20^\circ C$. [†] La cápside del VHB exhibe estructuras $T_r = 3$ y $T_r = 4$, compuestas de 90 y 120 dímeros, respectivamente [63]. En esta tabla se presentan únicamente los resultados relacionados con la cápside $T_r = 4$ del VHB. *El módulo de Young, E , asociado al VS40 fue estimado por C. Mendoza y D. Reguera [43] usando la constante de resorte experimental medida con el Microscopio de Fuerza Atómica (MFA) [121] mediante la ecuación $k_{\text{resorte}} = 2.25Eh^2/R$, que proviene de la TCD [102]. [‡] Los valores para el VLM fueron obtenidos mediante experimentos realizados en partículas virales inmaduras (cápside con material genético dentro), no en cápsides vacías [123].	77
Tabla 4.1:	Código cromático del diagrama de autoensamblaje combinado de la Fig. 4.15.	107

Acrónimos

ADNcd ADN de cadena doble. 7, 78

AECV Autoensamblaje de Cápsides Virales. XI, XIII, XV, XVII, XVIII, 2–5, 7–10, 15–17, 24–27, 32, 33, 36, 37, 39–42, 44–49, 51, 52, 55, 56, 58–63, 65, 66, 69, 75, 76, 78, 80–82, 85–92, 95, 97, 100, 103, 111–115

AEV Autoensamblaje de Virus. 7, 37, 115

ARNcd ARN de cadena doble. 7

ATP Adenosín Trifosfato. 7

DB Dinámica Browniana. 115

DM Dinámica Molecular. 79

FvK Föppl-von Kármán. 42, 84, 103

Gcs Genoma de cadena simple. 7, 132

HK97 Hong Kong 97. 9

IVW Iridovirus de Wiseana. XXIII, 77, 129

MFA Microscopio de Fuerza Atómica. XVII, XXIII, 77, 83, 84

MTB Microscopio de Túnel de Barrido. 83

pH potencial de Hidrógeno. 8, 18, 40, 81, 113

PV1 Proteína Viral 1. 78

SARS-CoV-2 Coronavirus de tipo 2 Causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo. 1

SIDA Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. 1

SMF Supersaturación Mínima de Frontera. 54, 91, 95

TAECV Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales. 2–5, 8, 9, 12, 25, 37, 40, 44, 78, 79, 81, 86, 89, 91, 113

TCD Teoría de Cáscaras Delgadas. XXIII, 77, 78, 84

TCN Teoría Clásica de Nucleación. 4, 5, 8–10, 16, 18, 24, 25, 32, 35, 37, 40, 41, 48, 62, 65, 66, 113, 115

- TCNCV** Teoría Clásica de Nucleación de Cápsides Virales. xi, 2–4, 8, 9, 102, 113
- TME** Trayectoria de Mínima Energía. xiii, xv, 45, 46, 48–51, 53, 57–59, 81, 91, 115
- VDR** Virus Diminuto de Ratón. xxiii, 77, 78, 129
- VEBI** Virus de la Enfermedad de Bursitis Infecciosa. 85, 129
- VHB** Virus de la Hepatitis B. xxiii, 7, 24, 25, 77, 129
- VHS** Virus del Herpes Simple. 7, 129
- VHS-1** Virus del Herpes Simple 1. 85, 129
- VIH** Virus de Inmunodeficiencia Humana. 1, 129
- VLM** Virus de Leucemia Murina. xxiii, 77, 129
- VMB** Virus del Mosaico del Bromo. 7, 129
- VMCC** Virus del Moteado Clorótico del Caupí. xxiii, 2, 7, 9, 25, 77, 78, 129
- VMT** Virus del Mosaico del Tabaco. 2, 7, 129
- VPc** Virus *Penicillium chrysogenum*. 9, 10, 20, 129
- VPH** Virus del Papiloma Humano. 7, 9, 10, 24, 25, 40, 129
- VS40** Virus de Simio 40. xvi, xxiii, 5, 7, 9, 25, 41, 77–80, 82, 113, 129

Introducción

Existe una diferencia importante en el significado biológico de los términos *virus* y *virión*. Por un lado, un virus es una partícula *nucleoprotéica* en la fase *intracelular* que no representa una amenaza para ningún organismo vivo; simplemente se trata de un conjunto de proteínas y ácidos nucleicos dispuestos en una estructura compleja que carece de la capacidad de infectar. Por otro lado, un virión se forma, en términos generales, de la cápside proteica, el material genético y, en algunos casos, de una envoltura membranosa [1-4]. Tanto la envoltura membranosa como la cápside protegen al material genético del virión mientras este se encuentra fuera de la célula hospedera, y juntos forman los componentes externos fundamentales para la transmisión, infección y replicación viral [3, 4]. A diferencia de los virus, los viriones tienen la capacidad de infectar células en el dominio *extracelular*. Su finalidad es replicarse, ya que no cuentan con la maquinaria biológica para reproducirse por sí mismos.

Aunque los biólogos lo consideran completamente inapropiado, en esta tesis se utiliza el término virus y virión de manera intercambiable para referirse al mismo ente biológico, es decir, a una partícula viral con la capacidad de infectar células.

Los virus pueden ser estudiados desde diversas perspectivas, según el marco bajo el cuál son analizados y los conocimientos que se espera obtener de ellos. En este sentido, los virus pueden categorizarse por (i) la simetría de sus cápsides, que pueden tener una estructura esférica (icosaédrica), helicoidal (tubular), prolata o compleja [2-6], (ii) su capacidad para infectar células susceptibles, (iii) las técnicas que utilizan para llevar a cabo su ciclo de replicación y (iv) por la naturaleza y polaridad de su material genético [7].¹

Estos entes biológicos han acompañado a la humanidad desde sus orígenes. Las interacciones entre *virus*, animales y seres humanos han dado lugar a diversos tipos de relaciones, desde el mutualismo beneficioso hasta el parasitismo perjudicial, y han tenido un impacto significativo, desencadenando importantes eventos históricos. La pandemia de la gripe española, que comenzó en 1918 y fue causada por el virus de la gripe A del tipo H1N1, se destaca como una de las más mortíferas de la historia [9]. El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la fase avanzada de la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), ha tenido un gran impacto negativo en la salud y la economía a nivel global [10]. 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, y sus consecuencias en la sociedad siguen estando presentes [11, 12]. Estos eventos son solo algunos ejemplos de cómo los virus han provocado cambios importantes en la vida cotidiana, la economía, la salud humana, la sociedad y en la investigación científica básica y médica.

¹La clasificación (iv) es conocida como la clasificación de Baltimore y actualmente es el marco conceptual primario del desarrollo de la virología [8].

La primera revista científica dedicada exclusivamente a la *virología*, establecida inicialmente como «*Archiv für die gesamte Virusforschung*» y posteriormente renombrada en 1975 como «*Archives of Virology*», publicó su primer volumen en 1939 [13]. Sin embargo, la humanidad en general y la comunidad científica en particular ya se habían interesado, investigado y experimentado en virus mucho antes de la creación de este espacio exclusivo para el registro de conocimientos científicos relacionados con estos agentes infecciosos. En 1935, el científico W. Stanley aisló y purificó en su forma cristalina por primera vez un virus; se trató del Virus del Mosaico del Tabaco (VMT), un virus helicoidal (tubular) con forma de bastón [14]. Posteriormente, en 1955, H. Fraenkel-Conrat y R. Williams demostraron la posibilidad de reconstituir *in vitro* y con alta eficiencia el VMT a partir de su genoma purificado y las subunidades proteicas (también llamadas capsómeros) que forman su cápside, sin requerir de una componente celular [15]. En 1967, J. Bancroft y E. Hiebert informaron sobre el autoensamblaje *in vitro* del Virus del Moteado Clorótico del Caupí (VMCC), convirtiéndolo en el primer virus esférico (icosaédrico) en ser reconstituido fuera de un organismo vivo [16]. Estos experimentos, entre muchos otros, demostraron la posibilidad de estudiar procesos virales complejos en condiciones artificiales controladas, abriendo nuevas perspectivas para investigar los mecanismos de replicación viral desde un enfoque fisicoquímico.

Aunque hace más de medio siglo se establecieron protocolos para llevar a cabo el ensamblaje *in vitro* de una gran cantidad de virus [17-19], y actualmente se conocen las estructuras de muchos de ellos hasta su resolución atómica [20-23], muchos de los mecanismos de Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV) y los procesos físicos subyacentes en el ciclo de replicación viral aún no se comprenden por completo. En busca de descifrar los intrincados mecanismos físicos que utilizan los virus para replicarse, ensamblar sus cápsides virales, adaptarse a condiciones ambientales extremas y *evolucionar*, surge la *virología física*.

La virología física es un campo emergente de investigación científica interdisciplinaria que busca comprender las propiedades físicas, estructurales y mecánicas de los virus [24-26]. Actualmente, la virología física concentra una activa y creciente investigación en áreas experimentales y teóricas que utilizan herramientas de la física para describir, en general, el ciclo de replicación viral y, en particular, aspectos como: (i) la entrada de virus en la célula hospedera [27, 28], (ii) el Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV) [29-36] y (iii) la encapsulación del material genético dentro de las envolturas proteicas [37-40], entre otros aspectos.

Los esfuerzos de muchos investigadores en áreas de interés de la virología física han proporcionado valiosa información sobre el proceso de replicación viral. En muchos casos, se asume que la *nucleación* es el mecanismo subyacente en el autoensamblaje de cápsides vacías, dada su analogía con la transición de fase clásica de primer orden, presente, por ejemplo, en la cristalización y la formación de micelas [24, 31, 36, 41-45]. Los avances en la investigación del AECV a través de la virología física, utilizando metodologías de diversas ramas de la física, han revelado una amplia gama de posibles aplicaciones, que van desde la encapsulación de materiales sintéticos y orgánicos en cápsides virales con fines biomédicos [46], hasta la terapia genética [47], el desarrollo de vacunas [12], y el uso de partículas virales como andamios para ensamblar nanocables de óxido de cobalto destinados a la fabricación de electrodos para baterías de iones de litio [48].

Esta tesis pretende contribuir al conocimiento científico al proporcionar una estructura integral y fácilmente generalizable de la teoría que describe el AECV, inicialmente propuesta por R. Zandi y colaboradores en 2006, conocida como Teoría Clásica de Nucleación de Cápsides Virales (TCNCV) [31]. La reformulación de una teoría físico-estadística que ofrece esta tesis y que aborda este fenómeno se denomina una Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales (TAECV). A través de ella, se busca caracterizar los mecanismos físicos más relevantes en el AECV esféricas (icosaédri-

cas), así como construir modelos teóricos que consideren los principales aspectos biológicos del ciclo de replicación viral.

En esta tesis, se presentan tres modelos teóricos del AECV vacías. En cada capítulo se incluye la construcción matemática de un modelo, su análisis físico y una discusión de los resultados junto con sus implicaciones biológicas. Todos los modelos describen la formación de una cápside esférica a partir de subunidades proteicas individuales o capsómeros (que pueden ser agregados de 2, 3, 5 o 6 subunidades proteicas y que constituyen los bloques fundamentales de formación de la cápside), utilizando parámetros relacionados con cantidades experimentales medibles. A medida que se avanza en la construcción del marco teórico, los modelos aumentan en complejidad para ofrecer una descripción menos idealizada y más precisa de las cápsides virales reales (¡pero aún ampliamente simplificada!). El tercer modelo, el más complejo, logra recuperar los resultados de los dos anteriores; el segundo, los resultados del primer modelo; y el primero consigue replicar los resultados documentados en la literatura con la TCNCV.

Desde ahora se advierte que los modelos presentados en esta teoría están significativamente distanciados de las estructuras macromoleculares reales que caracterizan a las cápsides virales auténticas y, por ende, de los componentes que constituyen a los virus en el contexto biológico y bioquímico. Aunque se consideran los aspectos biológicos pertinentes a través de parámetros físicos, estos modelos no examinan ni incorporan los detalles minuciosos de la síntesis e interacción entre proteínas que conducen a la formación de una cápside. Más bien, representan una esquematización biológica del AECV. En otras palabras, se estudia el comportamiento del sistema en su conjunto, es decir, como una población de subunidades (no especificadas) que se autoensamblan en una estructura compleja bajo ciertas condiciones fisicoquímicas. En este sentido, las interacciones individuales son reemplazadas por interacciones promedio o efectivas. Por ejemplo, las principales interacciones atractivas entre subunidades proteicas, como las interacciones hidrofóbicas, de van der Waals, y las electrostáticas apantalladas, se sustituyen con la *energía de enlace efectiva por subunidad*, Δg . Esta energía Δg está relacionada macroscópicamente con la cantidad de moléculas presentes en la solución del sistema y la concentración de subunidades libres mediante el término $n \Delta \mu$, donde n es el número de subunidades en una cápside parcial y $\Delta \mu$ es el potencial químico. Así, el producto $n \Delta \mu$ representa la diferencia de energía entre tener n subunidades libres en solución o agregadas formando una cápside parcial. Todas las otras influencias físicas del AECV se implementan a través de una serie de parámetros que regulan este proceso. Por lo tanto, el tratamiento teórico del AECV en esta tesis puede entenderse como una especie de teoría de campo medio aplicada a un sistema complejo.

El objetivo final no es desarrollar un modelo de infinita complejidad que contemple cada detalle de las cápsides reales de los virus y sus interacciones con múltiples proteínas y las moléculas del entorno. Más bien, se busca crear modelos suficientemente simples para ser analizados utilizando herramientas de diversas teorías físicas, y lo bastante razonables para proporcionar aspectos y resultados comparables con experimentos y simulaciones computacionales.

El desarrollo de una TAECV no solo impulsa el avance en la comprensión de la estructura y formación de los virus, sino que también desempeña un papel crucial en la eficiencia de la investigación científica. La implementación de modelos teóricos sólidos en la virología física conduce a un ahorro de tiempo y recursos financieros al proporcionar un marco predictivo. Estos modelos permiten diseñar escenarios y experimentos de autoensamblaje de manera detallada antes de llevar a cabo pruebas computacionales y de laboratorio, facilitando así la identificación efectiva de herramientas y estrategias prometedoras.

Los esfuerzos que supone esta tarea tienen como objetivo arrojar luz sobre los aspectos menos comprendidos del AECV al mismo tiempo que revelan los mecanismos que promueven o inhiben la producción de estas estructuras. En última instancia, se espera que estos modelos puedan llegar a generar ideas concretas aplicables en biotecnología, salud pública y tratamiento de enfermedades virales.

La hipótesis principal de la TAECV en esta tesis postula que la formación de una cápside vacía ocurre mediante un proceso de nucleación. Por consiguiente, se integran métodos de la teoría de autoensamblaje en equilibrio y la Teoría Clásica de Nucleación (TCN) homogénea para estudiar la dinámica y cinética del autoensamblaje de cápsides esféricas (icosaédricas). En este contexto, se obtienen soluciones analíticas para las cantidades clave en este proceso, como el tamaño crítico de una cápside parcial que permite su crecimiento posterior hacia una cápside completamente formada, la altura de la barrera de energía que debe superarse hacia el autoensamblaje, y el ritmo de autoensamblaje y desensamblaje de las cápsides. Este enfoque físico-estadístico busca proporcionar una comprensión simple pero profunda del AECV, estableciendo vínculos sólidos entre la teoría y los experimentos. Las contribuciones de esta tesis se presentan en cada uno de los capítulos que desarrollan los modelos de AECV. Estos capítulos ofrecen una estructura integral y de fácil generalización que reproducen los resultados documentados en la literatura (Capítulos 2, 3 y 4), además de una metodología y resultados completamente originales y novedosos (Capítulos 3 y 4). Los capítulos se describen a continuación:

El Capítulo 2, desarrolla el marco teórico de la TAECV mediante la construcción de la función de partición del sistema asociada al autoensamblaje de cápsides esféricas. Este modelo considera el escenario más simple de AECV, donde las contribuciones energéticas principales son: (i) la ventaja energética de tener n subunidades agregadas formando una cápside parcial, y (ii) el costo energético de tener algunas subunidades con menos vecinos en los bordes expuestos del agregado.

La formulación de la TAECV inicia con la derivación de funciones y variables termodinámicas clave, como la energía libre de Helmholtz y el potencial químico. Estas cantidades se utilizan posteriormente para calcular la energía libre de Gibbs de autoensamblaje, asociada a una cápside parcial con un número específico de subunidades, y para derivar las ecuaciones maestras que modelan la cinética del proceso. La metodología permite determinar el tamaño crítico de la cápside, la altura de la barrera de energía, y el ritmo de autoensamblaje y desensamblaje. Estas consideraciones físicas y matemáticas proporcionan una estructura formal a la TCNCV, replicando así los resultados previamente obtenidos por R. Zandi y colaboradores [31], que puede extenderse fácilmente a modelos más complejos.

El Capítulo 3 se centra en el análisis de la influencia de las contribuciones elásticas en el AECV esféricas en el límite donde la energía de flexión domina sobre la acumulación de esfuerzo de compresión, un aspecto no explorado individualmente por la comunidad científica ni desde la perspectiva de la TAECV propuesta en esta tesis. Este modelo considera el caso en el que la cápside se autoensambla debido a tres contribuciones energéticas (una adicional al modelo del Capítulo 2): (i) la ventaja energética de la agregación, (ii) la penalización energética asociada al borde de una cápside parcial, y (iii) el costo energético de las desviaciones de curvatura respecto a la curvatura preferencial. En este ámbito, se modela la penalización a la energía por efectos de curvatura mediante la introducción de la energía elástica, similar a la energía de flexión de una membrana, en la energía libre de Gibbs del sistema. Se analizan los parámetros clave de la teoría en función del número instantáneo de subunidades, n , y el radio instantáneo de curvatura, R . Específicamente, se estudia el paisaje de energía libre, la trayectoria global de autoensamblaje, el tamaño crítico y la altura de la barrera de energía. Además, se derivan expresiones analíticas para el ritmo de autoensamblaje y

desensamblaje utilizando las ideas de la TCN de sistemas multicomponentes. Por último, se estiman las propiedades geométricas y mecánicas de las cápsides reales de ciertos virus que están sometidas al mecanismo de compresión continua debido a la presencia de la energía de flexión en el sistema, con un enfoque especial en el caso del Virus de Simio 40 (VS40). Todas las cantidades físicamente relevantes de este modelo se contrastan con los resultados del «*modelo clásico*» del Capítulo 2. El análisis presetado en este capítulo ofrece argumentos físicos sólidos para entender mejor la selección del tamaño de cápsides virales, la naturaleza de las interacciones entre subunidades proteicas en etapas tempranas del autoensamblaje y los efectos de la compresión continua que podrían conducir a la producción de cápsides de tamaño subóptimo.

El Capítulo 4 considera el caso más general de esta tesis, en el que se modela el autoensamblaje de una cápside esférica que incluye todos los aspectos energéticos de los modelos anteriores, además de la presencia de proteínas de andamiaje en forma de un molde esférico preformado en la solución. Por lo tanto, este modelo contempla cuatro contribuciones energéticas: (i) la ventaja energética de la agregación, (ii) la penalización energética asociada al borde de una cápside parcial, (iii) el costo energético de la flexión por desviaciones de curvatura, y (iv) la energía de interacción entre el molde y los capsómeros. Al igual que en los modelos anteriores, se estudia el comportamiento de la altura de la barrera de energía, el tamaño crítico de una cápside parcial, y el ritmo de autoensamblaje. Se analiza cómo estas cantidades varían en función del tamaño del molde. Además, se examinan los diferentes mecanismos de autoensamblaje, evaluando las ventajas y desventajas de ensamblarse sobre el molde o fuera de él. Se introduce el concepto de diagramas de fase de autoensamblaje, propuesto anteriormente por otros autores como C. Mendoza y D. Reguera [43], y se generaliza su capacidad predictiva al considerar múltiples criterios energéticos para su generación. Por último, se estudian las desviaciones de curvatura respecto a la curvatura preferencial con el objetivo de determinar qué configuración de autoensamblaje es la más favorable en el contexto dinámico y cinético bajo condiciones fisicoquímicas establecidas.

Finalmente, en la Sección de [Conclusiones Generales](#), se condensan los resultados teóricos y las implicaciones biológicas en general de la TAECV, y en particular de cada uno de los modelos de AECV.

Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales

2.1 Introducción

Un aspecto sorprendente de los *virus* es la forma y simetría bien definida de sus cápsides, las cuales varían en tamaño y complejidad estructural [49]. En las condiciones fisiológicas adecuadas, la cápside de un virus puede ensamblarse (i) usando únicamente las subunidades proteicas [50], (ii) o en combinación con el material genético [16] o (iii) proteínas de andamiaje [51]. En cualesquiera de los casos, el proceso muestra algunas tendencias generales que parecen susceptibles para ser modeladas usando ideas físicas básicas [26, 29, 31, 52-54]. En particular, el autoensamblaje de la cápside de virus de Genoma de cadena simple (Gcs), *e.g.*, el Virus del Mosaico del Tabaco (VMT), y de una multitud de virus con forma esférica (icosaédrica) que infectan plantas [29, 55], animales y a los seres humanos, como el Virus de Simio 40 (VS40), el Virus del Herpes Simple (VHS) y el Virus del Papiloma Humano (VPH) está dirigido por la minimización de la energía libre y no requiere de energía en forma de Adenosín Trifosfato (ATP) [52]¹. Una vez ensamblada, las propiedades mecánicas, el tamaño, estructura y configuración de la cápside deben ser precisas para que el material genético se mantenga en las condiciones adecuadas mientras el *virión* flota sin rumbo hasta que se encuentra con un hospedador susceptible [2, 4, 41, 57, 58]. Por lo tanto, entender el mecanismo de Autoensamblaje de Virus (AEV) en el sumamente efectivo ciclo de replicación es necesario para determinar los factores físicos y químicos que controlan una infección viral exitosa.

En el campo en constante expansión de la virología física, se ha dedicado una atención considerable a los estudios teóricos [26, 29-31, 36, 52-54, 59, 60] y computacionales [61-63] para comprender las propiedades físicas y el mecanismo del AEV. Estos esfuerzos han arrojado valiosa información sobre el proceso de replicación viral, asumiendo, en algunos de ellos, que la nucleación es el mecanismo subyacente en el fenómeno del Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV) vacías [60], dada su analogía con la transición de fase clásica de primer orden presente, por ejemplo, en la cristalización y la formación de micelas [5, 30, 58]. Incluso se ha sugerido que la formación de una cápside viral a partir de subunidades proteicas (o capsómeros)² es un proceso termodinámico común a una amplia gama de virus [29], que incluye al VPH, VMT, Virus de la Hepatitis B (VHB), Virus del Moteado Clorótico del Caupí (VMCC) y Virus del Mosaico del Bromo (VMB). En estos casos, las cápsides se ensamblan de forma espontánea en una solución acuosa con las condiciones

¹En ciertos virus, el empaquetamiento de ácidos nucleicos dentro de una cápside viral preformada es una tarea que requiere de motores moleculares que utilizan la energía liberada de la hidrólisis de ATP [56]. Este es el caso del bacteriófago de ADN de cadena doble (ADNcd) $\phi 29$ [37, 38], así como de los bacteriófagos de ARN de cadena doble (ARNcd) $\phi 6$ y $\phi 12$ [40].

²Los 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 de VMCC se autoensambla a partir de capsómeros compuestos de dos subunidades proteicas. Es decir, los capsómeros del VMCC son dímeros [64].

adecuadas de concentración de subunidades, temperatura, pH y salinidad [31, 58], lo que hace que este proceso sea altamente susceptible a las condiciones ambientales. Además, tanto experimentos como simulaciones computacionales han proporcionado evidencia de rasgos característicos y genéricos del AECV [42], como lo es la correlación entre la producción de cápsides y la concentración de subunidades proteicas presentes en la solución,³ y la observación, únicamente, de subunidades proteicas y cápsides completamente formadas al término del ensamblaje.

En el presente capítulo, se proporcionan los fundamentos matemáticos necesarios para estudiar el AECV desde un punto de vista estadístico que contribuye a la estructuración integral y de fácil generalización de la Teoría Clásica de Nucleación de Cápsides Virales (TCNCV) inicialmente propuesta por R. Zandi y colaboradores [31]. En concreto, la contribución de este capítulo en la tesis se concentra en la conjugación de los métodos teóricos desarrollados anteriormente [31, 42] a la vez que se introduce una perspectiva integral del estudio de la formación de cápsides virales. En este ámbito, se discute la relación entre parámetros teóricos y experimentales que promueven o inhiben la producción de cápsides vacías. El capítulo se divide como sigue:

En la Sección 2.2, se exponen los elementos físicos y biológicos generales del AECV, a partir de donde se construye la Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales (TAECV) y la función de partición del sistema asociada a este fenómeno, antes proporcionada de forma puramente heurística. Posteriormente, se derivan ciertas funciones (potenciales) y variables termodinámicas relevantes, como la energía libre de Helmholtz, F , el potencial químico, μ y la energía libre de Gibbs de formación de una cápside vacía parcialmente formada, ΔG , que coincide con el resultado que se obtiene en el formalismo cuasiquímico de A. Luque [42]. La Sección 2.3 está dedicada a la introducción de la Teoría Clásica de Nucleación (TCN) y el origen de la barrera de energía. La implementación de estas ideas al AECV permite calcular el tamaño crítico del núcleo, n^* , y la altura de la barrera de energía de autoensamblaje, ΔG^* , de la misma manera que se computan en [31]. Más adelante, en la Sección 2.4, se deriva la teoría cinética del AECV mediante la TCN homogénea, a partir de donde se encuentra el ritmo de nucleación de ensamblaje, J , y se introduce el tiempo de nucleación, τ . La Sección 2.5 adapta y discute las ideas de la cinética de ensamblaje para describir el desensamblaje de las cápsides formadas y el fenómeno de histéresis, aspectos menos abordados por la comunidad científica. Finalmente, uno de los teoremas de nucleación se demuestra en la Sección 2.6, el cual establece una relación fundamental entre la teoría y experimento.

2.2 Construcción Estadística del Ensamblaje de Cápsides Virales

La construcción estadística de la TAECV utiliza una teoría de autoensamblaje en equilibrio y la TCN para describir el AECV vacías a partir de la unión (agregación) de subunidades proteicas libres o capsómeros. Dentro de este contexto, la TCN permite modelar una barrera de energía que proviene del coste energético que requiere la formación de una cápside parcial. Por un lado, cuando las proteínas se unen, pierden cierta libertad de movimiento, lo que se conoce como entropía configuracional [31], que es compensada por la energía libre de unión entre las subunidades proteicas, *e.g.*, las interacciones atractivas hidrofóbicas, de van der Waals, y eléctricas [58]. Por otro lado, durante la formación de la cápside, se forma un anillo en el borde de la esfera icosaédrica, como el que se muestra en la Fig. 2.1. Las proteínas en el borde de la cápside parcialmente formada no tienen todas las interacciones que están presentes en la estructura final completa. Esta falta

³Concretamente, debajo de una *concentración crítica* c^* no se ensamblan cápsides, mientras que por arriba de dicha concentración se promueve el autoensamblaje. Una vez formadas, las cápsides no se disocian fácilmente, incluso cuando la concentración de subunidades libres se reduce drásticamente.

de interacciones en el borde introduce un coste energético, lo que significa que se requiere energía adicional para completar la cápside. Esta energía adicional crea la barrera energética que debe superarse para que se inicie la formación de una nueva fase (cápside completamente formada) a partir de la fase preexistente (subunidades proteicas libres).

Inicialmente, las subunidades proteicas o capsómeros, que a partir de ahora serán también llamadas simplemente *subunidades*, se encuentran libres en una solución acuosa. Debido a fluctuaciones térmicas, las subunidades forman pequeños agregados que posteriormente serán las semillas de las cápsides completas.⁴ Si bien en el modelo no se especifica la clase de subunidades que forman la cápside viral, es importante notar que la descripción teórica, junto con sus resultados, son válidos para diferentes tipos (o *especies*) de subunidades, *e.g.*, subunidades proteicas (monómeros) en el caso del Virus *Penicillium chrysogenum* (VPc) [65], dímeros para el VMCC [64], pentámeros para el VS40 [66] y el VPH [50], o pentámeros y hexámeros para el bacteriófago Hong Kong 97 (HK97) [67].

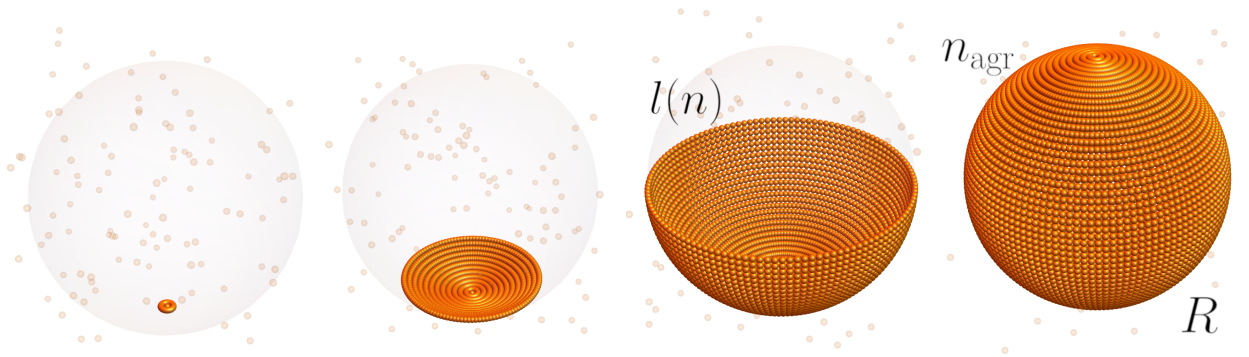


Figura 2.1: Representación esquemática del AECV. El proceso de autoensamblaje se despliega de izquierda a derecha. Inicialmente, las subunidades libres, previamente dispersas en la solución, comienzan a asociarse por fluctuaciones térmicas formando agregados que actúan como un embrión de la cápside. Estas cápsides parciales pueden crecer o decrecer en tamaño y se caracterizan por tener un borde expuesto de longitud $l(n)$, cuya magnitud depende de 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. Durante todo el proceso, se asume que los agregados intermedios son casquetes esféricos de radio R . Este radio, en de la TCNCV, se mantiene constante hasta alcanzar la estructura final con n_{agr} subunidades.

Existen dos maneras diferentes, pero equivalentes, de modelar el autoensamblaje: (i) a través del formalismo cuasiquímico y (ii) mediante la descripción de fase. En el primer enfoque, los agregados de subunidades de diferentes tamaños son considerados como especies químicas distintas, cada una con un potencial químico μ asociado. En contraste, el segundo proceso implica una transición de fase desde las subunidades libres hacia la formación de la cápside completa, y es comúnmente utilizada en la TCN. El formalismo cuasiquímico fue introducido por A. Luque [42], inspirado por F. Kuni y colaboradores [68, 69], con el propósito de ampliar el enfoque de transición de fase en la TCNCV previamente presentado por R. Zandi y colaboradores [31]. A continuación, se unifican estos dos métodos para extraer la información que ambos brindan de manera independiente, prestando especial atención a las omisiones matemáticas y estadísticas identificadas en trabajos previos, con el propósito de formular la TAECV.

⁴Un núcleo es considerado como el agregado intermedio más pequeño de ensamblaje con más de 50 % probabilidades de crecer hacia una cápside viral completa en lugar de desensamblarse [26].

El objetivo principal es proporcionar los elementos matemáticos para calcular el valor de ciertas variables termodinámicas relevantes, tales como la presión y la energía libre (función de estado), para luego implementarlas en la TCN. Dado que las variables termodinámicas están bien definidas en un *macroestado* del ensamble, la tarea se reduce a determinar la fracción de sistemas dentro del ensamble que se encuentra en cierto *microestado*. En otras palabras, se busca la probabilidad de que, al seleccionar al azar un sistema del ensamble, este se encuentre en un estado preciso, por ejemplo, en una distribución y organización específica de subunidades en agregados de tamaño n . Por lo tanto, es necesario calcular la cantidad de microestados, Ω , que corresponden a un determinado macroestado, lo que permite determinar la función de partición del ensamble. Para esto, se emplea un modelo de celda que consta de un solvente, cuyos efectos se consideran solo implícitamente, en el que se encuentran disueltas las subunidades libres, así como las cápsides parcial y completamente formadas. Es importante destacar que los potenciales intermoleculares, que representan las interacciones subunidad-subunidad y agregado-subunidad, se expresan directamente en la energía libre como términos independientes.

Siguiendo condiciones experimentales típicas, considere un sistema polidisperso, *i.e.*, un conjunto de partículas dentro de una solución que varían en tamaño, forma u otras características,⁵ en un volumen V y a una temperatura T . El sistema contiene N_n partículas de la especie n ($n = 1, 2, \dots$), las cuales se componen de n subunidades. Si N representa al número total de subunidades en la solución, entonces

$$N = \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}} nN_n, \quad (2.1)$$

en donde n_{agr} es el *número de agregación* o el número de subunidades en una cápside completamente formada, *e.g.*, $n_{\text{agr}} = 60$ en una cápside $T_r = 1$ de VPc [65] y $n_{\text{agr}} = 72$ en una cápside $T_r = 7$ de VPH [50].⁶ En un sistema de este tipo, es posible dividir el espectro de agregación en un gran número de grupos, lo que es denominado *celdas de agregación*. Suponiendo que el volumen de una celda individual es v_c , se calcula que el número de celdas está dado por⁷

$$M = \frac{V}{v_c}. \quad (2.2)$$

Entonces,

$$\Omega(N_n, V) = \sum_{\{N_n\}} W\{N_n\}, \quad (2.3)$$

es el número de microestados accesibles en el ensamble y $W\{N_n\}$ es el número de microestados diferentes asociados a la distribución $\{N_n\}$. La suma $\sum_{\{N_n\}}$ se realiza sobre todos los conjuntos de distribuciones que satisfacen la Ec. (2.1). A su vez

$$W\{N_n\} = \prod_{n=1}^{n_{\text{agr}}} w(n), \quad (2.4)$$

⁵La *polidispersidad* es una característica común en muchos sistemas naturales y sintéticos. Por ejemplo, las suspensiones coloidales, las emulsiones y los tejidos biológicos a menudo presentan polidispersidad debido a la variabilidad inherente en el tamaño, la forma y la composición de sus partículas o componentes individuales [70]. En el marco del AECV, la polidispersidad se refiere a que en este sistema se pueden encontrar subunidades libres, cápsides parciales de todos los tamaños ($1 < n < n_{\text{agr}}$) y cápsides completamente formadas.

⁶El *principio de cuasi-equivalencia*, presentado por Caspar y Klug en [5], se emplea para clasificar el número y disposición de los capsómeros en una cápside esférica (icosaédrica). En términos sencillos, el número T_r indica el número de posiciones cuasi-equivalentes que ocupa una subunidad proteica en la formación de la cápside.

⁷El tamaño de las celdas se elige de tal forma que, en un momento dado, únicamente el centro de masa de un subunidad o de un fragmento de cápside puede ocupar una celda [31].

en donde $w(n)$ es el número de microestados diferentes asociados a las N_n partículas que se acomodan en los M sitios. En este caso, ningún sitio puede contener más de un agregado y por lo tanto N_n no puede ser más grande que M . Esto sugiere que $w(n)$ es realmente el número de formas en las que N_n partículas indistinguibles se pueden distribuir en las M celdas. Con estos criterios, $w(n)$ está dado por [71, 72]

$$w(n) = \frac{M!}{N_n!(M - N_n)!}, \quad (2.5)$$

de manera que

$$\Omega(N_n, V) = \sum_{\{N_n\}} \prod_{n=1}^{n_{\text{agr}}} \frac{M!}{N_n!(M - N_n)!}. \quad (2.6)$$

Adicionalmente, la función de partición del ensamble está compuesta por nN_n sistemas con energía de interacción despreciable, *i.e.*, no hay colisiones entre agregados de distintos tamaños. De esta manera, la suma sobre todos los posibles estados puede escribirse como

$$Q_{N_n} = \sum_{\{N_n\}} \prod_{n=1}^{n_{\text{agr}}} \frac{M!}{N_n!(M - N_n)!} (q_n)^{N_n}, \quad (2.7)$$

en donde, nuevamente, la suma $\sum_{\{N_n\}}$ representa la distribución de tamaños de grupos de subunidades que satisfacen la Ec. (2.1). El producto $\prod_{n=1}^{n_{\text{agr}}}$ simboliza el producto de probabilidades asociadas con cada uno de los tamaños disponibles de agregación. El factor combinatorio (sin repeticiones) representa el número de configuraciones distinguibles de las partículas sobre las celdas. Finalmente, el producto de las funciones de partición individuales q_n indica que las subunidades están tan diluidas que las interacciones entre ellas pueden ser despreciadas, es decir, cada una de las n especies es *estadísticamente independiente*.

Como en muchos de los sistemas en física estadística [71, 72], la función de partición en la Ec. (2.7) (o Ω en la Ec. (2.6)) puede representarse mediante su término máximo o representativo, $Q_{N_n^*}^*$.⁸ De manera análoga, la distribución en equilibrio de N_n se caracteriza por la distribución que le corresponde a ese máximo, a saber, N_n^* . Para encontrar estas dos expresiones, se utiliza el método de multiplicadores indeterminados de Lagrange y, por simplicidad en el manejo de números grandes, productos y sumas, se emplea $\ln Q_{N_n^*}^*$ en vez de $Q_{N_n^*}^*$. El logaritmo natural de la función de partición $Q_{N_n^*}^*$ es

$$\begin{aligned} \ln Q_{N_n^*}^* &= \ln \left\{ \prod_{n=1}^{n_{\text{agr}}} \left[\frac{M!}{(M - N_n^*)! N_n^*!} (q_n)^{N_n^*} \right] \right\} = \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}} \ln \left[\frac{M!}{(M - N_n^*)! N_n^*!} (q_n)^{N_n^*} \right] \\ &= \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}} \left\{ \ln [M! (q_n)^{N_n^*}] - \ln [(M - N_n^*)! N_n^*!] \right\}, \end{aligned} \quad (2.8)$$

que, al aplicar las propiedades de logaritmos, junto con la *aproximación de Stirling*,⁹ se puede

⁸En el límite termodinámico, el estado derivado del término representativo se convierte en el estado más probable, ya que tendrá una frecuencia mayor que cualquier otra posible, y por lo tanto, dicha distribución es la que va a contribuir efectivamente al valor de Ω y Q .

⁹La formulación matemática de la aproximación de Stirling es

$$\ln n! \approx n \ln n - n, \quad (2.9)$$

siendo n un entero positivo grande. Esta aproximación será más precisa a medida que n sea más grande.

reescribir como

$$\begin{aligned}\ln Q_{N_n^*}^* &= \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}} \{ \ln M! + N_n^* \ln q_n - \{ \ln [(M - N_n^*)!] + \ln N_n^*! \} \} \\ &= \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}} [M \ln M + N_n^* \ln q_n - (M - N_n^*) \ln(M - N_n^*) - N_n^* \ln N_n^*].\end{aligned}\quad (2.10)$$

Al tomar la derivada parcial de $\ln Q_{N_n^*}^*$ respecto a N_n^* , se obtiene lo siguiente:

$$\frac{\partial \ln Q_{N_n^*}^*}{\partial N_n^*} = \ln q_n + \ln(M - N_n^*) - \ln N_n^*. \quad (2.11)$$

El conjunto de N_n^* que maximiza a Q , sujeto a la condición en la Ec. (2.1), cumple con que

$$\frac{\partial}{\partial N_n^*} \left(\ln Q_{N_n^*}^* - \sum_n^{n_{\text{agr}}} \alpha n N_n^* \right) = 0, \quad (2.12)$$

siendo α un multiplicador de Lagrange. Ahora, sustituyendo la Ec. (2.11) en la relación anterior se obtiene una relación entre N_n^* , q_n y α , *i.e.*,

$$\ln \left[\frac{q_n (M - N_n^*)}{N_n^*} N_n^* \right] = \alpha n. \quad (2.13)$$

Resolviendo para N_n^* se encuentra que

$$N_n^* = \frac{q_n M e^{\alpha n}}{1 + q_n e^{\alpha n}} \quad (2.14)$$

es la distribución que corresponde al máximo de la función de partición.

Es importante mencionar que las N_n partículas en un sistema de este tipo típicamente poseen grados de libertad traslacional, de energía interna, de tensión lineal e incluso grados de libertad eléctricos, nucleares y vibracionales, entre otros. Dado que los hamiltonianos son separables en cada uno de los casos, al menos como una aproximación [71], se concluye que

$$q_n = q_{n_{\text{tras}}} \cdot q_{n_{\text{interna}}} \cdot q_{n_{\text{ltension}}} \cdots q_{n_{\text{elec}}} \cdot q_{n_{\text{nucle}}} \cdot q_{n_{\text{vib}}}. \quad (2.15)$$

Por los alcances de la investigación, se consideran únicamente los primeros tres grados de libertad mencionados anteriormente, por lo que q_n se reduce a

$$q_n = q_{n_{\text{tras}}} \cdot q_{n_{\text{interna}}} \cdot q_{n_{\text{ltension}}} = \exp \left[-\frac{1}{k_B T} (f_n + \sigma_n + t_n) \right], \quad (2.16)$$

en donde q_{n_i} se ha expresado en la forma del ensamble canónico, incluyendo la energía libre, f_n , la energía de tensión lineal de una cápside incompleta, σ_n , y energía de traslación de una partícula dentro de una celda, t_n . Los distintos grados de libertad mencionados en la ecuación previa serán analizados en detalle posteriormente. No obstante, puede concluirse de inmediato que la función de partición individual en el grado de libertad traslacional es [71]

$$q_{n_{\text{tras}}} = \exp \left(-\frac{t_n}{k_B T} \right) = \frac{v_c}{\Lambda_n^3}. \quad (2.17)$$

En las siguientes secciones, se obtiene la energía libre de Helmholtz, la ley de acción de masas para las subunidades libres y las cápsides completamente formadas, y, a partir de esta última relación, la energía libre de Gibbs, que es el componente fundamental en la TAECV.

2.2.1 Energía Libre del Ensamble

La energía libre de Helmholtz total del sistema, F , puede calcularse con la relación estadística clásica, a saber [71, 72]¹⁰

$$F = -k_B T \ln Q_{N_n^*}^*, \quad (2.18)$$

de manera que al usar la Ec. (2.10), se escribe

$$F = -k_B T \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}} [M \ln M + N_n^* \ln q_n - (M - N_n^*) \ln(M - N_n^*) - N_n^* \ln N_n^*]. \quad (2.19)$$

Al notar que $M = (M - N_n^*) + N_n^*$, la ecuación anterior se expresa como sigue:

$$\begin{aligned} F &= -k_B T \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}} \left\{ (M - N_n^*) \ln [(M - N_n^*) + N_n^*] + N_n^* \ln [M - N_n^* + N_n^*] + N_n^* \ln q_n \right. \\ &\quad \left. - (M - N_n^*) \ln(M - N_n^*) - N_n^* \ln N_n^* \right\} \\ &= k_B T \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}} \left[(M - N_n^*) \ln \left(\frac{M - N_n^*}{M} \right) + N_n^* \ln \left(\frac{N_n^*}{M} \right) - N_n^* \ln q_n \right]. \end{aligned} \quad (2.20)$$

En el caso en el que $N_n^*/M \ll 1$, *i.e.*, cuando la solución de subunidades está muy diluida, el primer término de la Ec. (2.20) puede ser expresado en una serie de potencias de N_n^*/M y mantener solamente el término lineal. Esto es

$$\ln \left(\frac{M - N_n^*}{M} \right) = \ln \left(1 - \frac{N_n^*}{M} \right) \approx -\frac{N_n^*}{M}, \quad (2.21)$$

lo que conduce a

$$F = k_B T \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}} \left[-\frac{N_n^*}{M} (M - N_n^*) + N_n^* \ln \left(\frac{N_n^*}{M} \right) - N_n^* \ln q_n \right]. \quad (2.22)$$

Debido a que se han ignorado términos de orden mayor a uno, la expresión anterior toma la siguiente forma:

$$F = k_B T \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}} N_n^* \left[\ln \left(\frac{N_n^*}{M} \right) - 1 + \beta(f_n + \sigma_n + t_n) \right], \quad (2.23)$$

en donde se ha usado la forma explícita de q_n en la Ec. (2.16). Posteriormente, al definir la densidad numérica del componente como

¹⁰ Si la presión, en lugar del volumen, es la variable que se mantiene constante en el ensamble, el potencial termodinámico apropiado (función de estado) sería la energía libre de Gibbs, G . Sin embargo, dado que se espera que las contribuciones de trabajo presión-volumen sean muy pequeñas con respecto a la energía total de la solución, incluido el solvente, la descripción que utiliza la energía libre de Helmholtz es equivalente a todos los efectos prácticos. Más aún, las fluctuaciones en el volumen en el gas ideal son de una millonésima, de acuerdo con $(\langle V^2 \rangle - \langle V \rangle^2) / \langle V \rangle \approx 1/\sqrt{N}$, lo que indica que las fluctuaciones en el volumen disminuirán aún más en los sistemas biológicos de interés que sean más complejos que un gas monoatómico ideal, *e.g.*, una proteína [73]. Considerando estos argumentos, en la Sección 2.2.2 se deriva G a partir de las condiciones de equilibrio termodinámico en F .

$$\rho_{N_n^*} \equiv \frac{N_n^*}{V}, \quad (2.24)$$

y hacer uso de la Ec. (2.2), se obtiene que la energía libre de Helmholtz es

$$F = k_B T \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}} N_n^* [\ln(\rho_{N_n^*} v_c) - 1 + \beta(f_n + \sigma_n + t_n)]. \quad (2.25)$$

Toda la termodinámica del sistema se puede determinar a partir de la Ec. (2.25) usando la definición de esta función de estado, *i.e.*,

$$F = U - TS, \quad (2.26)$$

en donde U es la energía interna, T la temperatura y S la entropía, y la relación termodinámica fundamental,

$$dF = -S dT - p dV + \sum_n \mu_n dN_n. \quad (2.27)$$

En consecuencia, la entropía, presión y potencial químico están dados por

$$S = -\left(\frac{\partial F}{\partial T}\right)_{V, N_n^*}, \quad p = -\left(\frac{\partial F}{\partial V}\right)_{T, N_n^*}, \quad \mu_n = \left(\frac{\partial F}{\partial N_n^*}\right)_{T, V, N_{n \neq j}^*}. \quad (2.28)$$

Por ejemplo, el potencial químico del ensamble en cuestión, que se obtiene utilizando la Ec. (2.20) es

$$\mu_n = \left(\frac{\partial F}{\partial N_n^*}\right)_{T, V, N_{n \neq j}^*} = -k_B T \left(\frac{\partial \ln Q_{N_n^*}^*}{\partial N_n^*}\right)_{T, V, N_{n \neq j}^*} = -k_B T \ln \left[\frac{(M - N_n^*) q_n}{N_n^*} \right]. \quad (2.29)$$

Después, al sustituir la Ec. (2.14) en la ecuación anterior, se obtiene

$$\mu_n = -k_B T \ln \left[\frac{e^{-\alpha n} (1 + q_n e^{\alpha n})}{1 + q_n e^{\alpha n}} \right], \quad (2.30)$$

donde se puede ver que

$$\mu_n = k_B T \alpha n. \quad (2.31)$$

A partir de entonces, es posible determinar completamente la forma del multiplicador α , a saber

$$\alpha = \frac{\mu_n}{n k_B T}. \quad (2.32)$$

La ecuación anterior permite establecer la siguiente relación:

$$\alpha = \frac{\mu_1}{k_B T} = \frac{\mu_n}{n k_B T}, \quad (2.33)$$

y a través de ella,

$$\mu_n = n \mu_1. \quad (2.34)$$

La ecuación (2.34) es una representación de la ley de acción de masas y una consecuencia de la distribución en equilibrio termodinámico de las subunidades sobre los estados de ensamble y desensamble. Finalmente, haciendo uso de los resultados previos, la distribución característica de la Ec. (2.14) se reescribe como

$$N_n^* = \frac{M q_n e^{\mu_1 n \beta}}{1 + q_n e^{\mu_1 n \beta}}. \quad (2.35)$$

2.2.2 Ley de Acción de Masas y Energía Libre de Gibbs

La energía libre de Helmholtz de la Ec. (2.25) y el potencial químico de la Ec. (2.29), también se pueden expresar como

$$F = k_B T \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}} N_n^* [\ln(\rho_{N_n^*} v_c) - 1 + \beta(n g_n + \sigma_n)] \quad (2.36)$$

y

$$\mu_n = k_B T \ln(\rho_{N_n^*} v_c) + n g_n + \sigma_n, \quad (2.37)$$

respectivamente. En las dos ecuaciones anteriores se ha incluido la *energía de enlace efectiva por subunidad*, *i.e.*, $g_n \equiv (f_n + t_n)/n$. Es importante destacar que la Ec. (2.37) presenta la estructura típica del potencial químico estándar para una mezcla ideal de partículas no interactuantes [74], particularmente, los dos términos finales la ecuación anterior dependen implícitamente del estado de referencia, s . Asimismo, la distribución en equilibrio de los agregados en el ensamble se puede obtener fácilmente al minimizar la energía libre de Gibbs, que se calcula más adelante. Esta minimización puede ser determinada a través de las Ec. (2.37), lo que da como resultado la Ec. (2.34).

Debido a que en condiciones experimentales de laboratorio es común utilizar concentraciones volumétricas, *i.e.*, la cantidad de sustancia c_n , en vez de las densidades numéricas de las componentes, se sustituye $\rho_{N_n^*} v_c$ por c_n/c_s , siendo c_s la concentración del solvente.¹¹ Usando los argumentos anteriores, a partir de la Ec. (2.37), se encuentra que (consultar las Ecs. (2.2) y (2.24))

$$\left(\frac{c_n}{c_s}\right) = \exp[\beta(\mu_n - n g_n - \sigma_n)]. \quad (2.38)$$

Ahora, si $n = 1$ en la Ec. (2.38), se tiene que

$$\left(\frac{c_1}{c_s}\right) = \exp[\beta(\mu_1 - g_1)], \quad (2.39)$$

ya que $\sigma_n = \sigma_{n_{\text{agr}}} = 0$, debido a que la tensión lineal en el borde es inexistente para las subunidades libres y las cápsides completamente formadas. Al elevar el inverso multiplicativo de la ecuación anterior a la n , y usando la Ec. (2.38), se encuentra lo siguiente:

$$\left(\frac{c_n}{c_s}\right) \left(\frac{c_s}{c_1}\right)^n = \exp[\beta\mu_n - \beta(n g_n + \sigma_n)] \exp[-\beta n(\mu_1 - g_1)], \quad (2.40)$$

a partir de donde, en el equilibrio (véase la Ec. (2.34)), se obtiene

$$\left(\frac{c_n}{c_1^n}\right)^{\text{eq}} = \frac{1}{c_s^{n-1}} \exp[-\beta(n \Delta g + \sigma_n)] \equiv k_n^{\text{eq}}, \quad (2.41)$$

siendo $\Delta g = g_n - g_1$ y k_n^{eq} la constante de equilibrio, la cual es independiente del número total de subunidades en la solución. La Ec. (2.41) es conocida como la ley de acción de masas [31, 42, 74]. Dicha ley también se puede reformular como

$$c_n^{\text{eq}} = c_s \left(\frac{c_1}{c_s}\right)^n \exp[-\beta(n \Delta g + \sigma_n)] = c_1^n k_n^{\text{eq}}. \quad (2.42)$$

Aunado a esto, al aplicar propiedades de logaritmos, se puede ver que

¹¹En el AECV vacías el solvente está usualmente compuesto por agua. Por esa razón, se elige la molaridad del agua pura, $c_s = 56M$, como estado de referencia [31, 42, 52, 58].

$$\left(\frac{c_1}{c_s}\right)^n = \exp \left[n \ln \left(\frac{c_1}{c_s} \right) \right], \quad (2.43)$$

lo que conduce a

$$c_n^{\text{eq}} = c_s \exp \left\{ -\beta \left[n \left(\Delta g - \frac{1}{\beta} \ln (c_1/c_s) \right) + \sigma_n \right] \right\}. \quad (2.44)$$

La ley de acción de masas, Ec. (2.41), se puede reescribir como un factor de Boltzmann en equilibrio, a saber, [42]

$$c_n^{\text{eq}} = c_s \exp [-\beta \Delta G(n)], \quad (2.45)$$

en donde

$$\Delta G(n) = n \left[\Delta g - \frac{1}{\beta} \ln (c_1/c_s) \right] + \sigma_n, \quad (2.46)$$

es la energía libre total (energía libre de Gibbs) requerida para ensamblar una cápside parcial a partir de n subunidades.¹² Esta energía contiene: (i) la diferencia de energía resultante de tener las subunidades en la cápside o en solución Δg , (ii) una penalización entrópica que surge de remover n subunidades de la solución para formar un agregado, *i.e.*, $-n \ln(c_1/c_s)/\beta$, que claramente depende de la concentración de subunidades libres c_1 y (iii) el coste energético asociado a la tensión lineal en el borde de la cápside parcial, σ_n (consultar Fig. 2.1). En consecuencia, a partir de la distribución en equilibrio de los tamaños de agregados c_n^{eq} o, de manera equivalente, al medir las constantes de equilibrio de las n especies, k_n^{eq} , se puede calcular la energía libre de cualquier cápside parcialmente formada.

Estos resultados parecen indicar que el AECV podría considerarse como un proceso de agregación en equilibrio. Sin embargo, existen dos observaciones físicas que apuntan hacia la existencia de una barrera de energía que debe superarse durante la formación de una cápside [30, 31]: (i) el hecho de que el *desensamblaje* de cápsides proteicas no ocurra en las mismas condiciones que el ensamblaje [75, 76], y (ii) la detección de cantidades extremadamente reducidas de agregados intermediarios [26, 50, 53, 54, 58].

En la siguiente sección, se analiza el origen de la barrera de energía y se deriva la energía libre necesaria para la formación de una cápside parcialmente formada, siguiendo las pautas convencionales de la TCN.

2.3 Teoría Clásica de Nucleación de Cápsides Virales

La nucleación es el proceso a través del cual se inicia la formación de una nueva fase en un sistema físico. Se trata de un fenómeno fundamental en las transiciones de fase de primer orden, donde un número mínimo de átomos, iones o moléculas se han de agrupar en la fase metastable como punto de partida para un crecimiento posterior hacia la fase termodinámicamente estable [77, 78]. La nucleación ha sido objeto de estudio en diversas disciplinas, desde la biofísica hasta la cosmología, y en sistemas que abarcan desde escalas atómicas hasta planetarias [79]. En esta sección, se implementan las ideas de la TCN a la formación de una cápside viral.

¹²La energía libre $\Delta G(n)$ no depende de ninguna concentración c_n ($n \geq 2$) y es válida aún cuando la concentración de agregados de tamaño n no ha alcanzado el equilibrio de agregado.

2.3.1 Analogía Vapor-Líquido

La agregación espontánea de la cápside se debe a que las subunidades que componen su estructura poseen una energía más baja que cuando están libres en la solución (véase la Ec. (2.46)). Por arriba de una concentración umbral específica (crítica) c^* , esta ventaja energética supera a la penalización que supone remover una subunidad de la solución, y por lo tanto, el autoensamblaje se convierte en un proceso termodinámicamente favorable [31, 52]. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el AECV vacías es un proceso discreto en el que cada subunidad, de forma independiente, se añade a una estructura intermedia de tamaño n . Este proceso tiene un costo energético, *i.e.*, la penalización del borde, que surge de la pérdida de interacciones estabilizadoras de una subunidad libre al colocarla en el borde de una cápside en formación (ver Fig. 2.2).

La situación es análoga a una transición de fase vapor-líquido, donde la formación de una gota de líquido en la fase vapor tiene una penalización energética asociada a la tensión superficial. En este contexto, y dentro de la teoría clásica, los agregados más pequeños son modelados como pequeñas gotas de líquido con densidad uniforme, el mismo valor de la tensión superficial que la del líquido macroscópico y una interfase esférica y bien definida con el vapor [31]. Bajo estas aproximaciones, la energía libre de formación de un agregado que contiene n moléculas se puede expresar como [77, 80]

$$\Delta G(n) = n(\mu_l - \mu_v) + \sigma A_n, \quad (2.47)$$

en donde μ_l es el potencial químico por molécula en la fase líquida, μ_v es el potencial químico en el vapor, σ es la tensión superficial de la gota y A_n su área superficial. De manera análoga, la formación de una cápside esférica se puede considerar como un proceso de cristalización en dos dimensiones sobre una superficie curvada. A través de esta analogía, la manera más simple de abordar el coste energético de falta de interacciones en el AECV es introduciendo una penalización de *energía de borde*, que juega un papel equivalente a la energía de superficie en este caso bidimensional. Esta energía está vinculada a una *tensión lineal*, τ_λ , que representa el coste energético por unidad de longitud en el borde de la cápside. En la formación de la capa bidimensional de la cápside, esta τ_λ juega un papel análogo a la tensión superficial, σ , en una gota.

Las cápsides, ya sean parcial o completamente formadas, se tratan como agregados de subunidades proteicas, mientras que las contribuciones de la tensión en el borde solo se manifiestan en cápsides incompletas. Se considera un estado inicial en el que todas las subunidades están dispersas en una solución acuosa, y una fase final en la que una fracción finita, f , de la concentración de subunidades está asociada a cápsides completamente formadas. Siguiendo esta hipótesis, la Ec. (2.1) se reformula de la siguiente manera:

$$N = N_1 + n_{\text{agr}} N_{\text{agr}}, \quad (2.48)$$

y la fracción de concentración de subunidades se expresa como

$$f = \frac{n_{\text{agr}} c_{\text{agr}}}{c}, \quad (2.49)$$

en donde

$$c = c_1 + n_{\text{agr}} c_{\text{agr}}, \quad (2.50)$$

representa la concentración total de subunidades en el sistema.

El evidente que en este modelo se consideran únicamente subunidades proteicas libres o cápsides completamente formadas en el sistema. Esta aproximación refleja el hecho que, debido al coste energético del borde, la población de cápsides parciales de tamaño N_n será mucho menor que la de subunidades libres o cápsides completas.

Los argumentos expuestos anteriormente permiten proponer una expresión termodinámica, muy similar a la Ec. (2.47), para la energía libre de la formación de una cápside parcialmente formada que contiene n subunidades. Bajo la premisa de que las cápsides posean un radio de curvatura constante, denotado como R , independientemente de su estado de completitud, y que la capa sea lateralmente incompresible, la energía libre de Gibbs de una cápside en proceso de crecimiento puede ser formulada como [31, 52]

$$\Delta G(n) = n \left[\Delta g - \frac{1}{\beta} \ln (c_1/c_s) \right] + \sigma_n = n\Delta\mu + \tau_\lambda l(n). \quad (2.51)$$

con $\sigma_n \equiv \tau_\lambda l(n)$ y en donde la diferencia de potencial químico está dada por

$$\Delta\mu = -k_B T \ln (c_1/c^*), \quad (2.52)$$

a la vez que la *concentración umbral*, c^* , que juega el mismo papel que la saturación o densidad de equilibrio en una transición de vapor-líquido, se define como

$$c^* \equiv c_s \exp \left(\frac{\Delta g}{k_B T} \right). \quad (2.53)$$

El primer término del extremo derecho de la Ec. (2.51), $n\Delta\mu$, refleja la contribución asociada a la energía de unión, que depende del pH, la concentración de sal, temperatura y la presencia de pequeñas moléculas, *e.g.*, iones y agentes caotrópicos. Particularmente, si $c_1 < c^*$ la diferencia de potencial químico es positiva, indicando que de ninguna manera la energía de unión podría compensar la penalización entrópica de remover una subunidad de la solución y que, por lo tanto, el proceso no es favorable. En contraste, si $c_1 > c^*$, se desencadena el autoensamblaje, pero aún se debe superar una barrera de energía para crecer y formar una cápside completa. Adicionalmente, el término $\tau_\lambda l(n)$ de la Ec. (2.51) modela la energía total del borde de una cápside en proceso de formación [31]. Dicha energía se origina a partir de la tensión lineal τ_λ y la longitud del borde $l(n)$, tal como se ilustra en la Figura 2.2.

La siguiente sección se enfoca en derivar la expresión de la función $l(n)$ teniendo en cuenta las aproximaciones las consideraciones físicas mencionadas anteriormente en relación a la TCN.

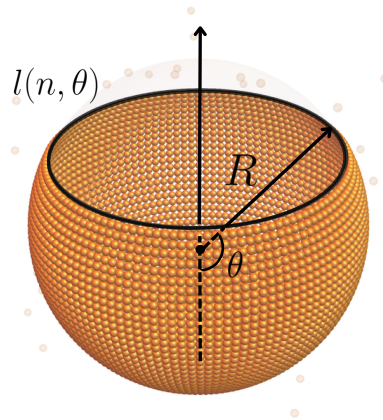


Figura 2.2: Representación esquemática del modelo continuo de una cápside esférica parcialmente formada. $l(n, \theta)$ representa la longitud del borde, R su radio y θ el ángulo que caracteriza el grado de completitud de la cápside.

2.3.2 Una Estimación Simple de la Energía de Borde

Suponga que el radio R de la cápside se mantiene invariable durante el proceso de crecimiento y que el área efectiva ocupada por una subunidad en la cápside es a_1 . Por lo tanto, es factible expresar a_1 en función del número de agregación n_{agr} , a saber,

$$a_1 = \frac{4\pi R^2}{n_{\text{agr}}}. \quad (2.54)$$

Por un lado, en la Fig. 2.2 se aprecia que la longitud del borde de un casquete esférico de radio R y ángulo de completitud θ viene dada por

$$l(\theta) = 2\pi R \sin \theta. \quad (2.55)$$

Por otro lado, se puede calcular el número de subunidades n que constituyen una cápside incompleta utilizando el área superficial de una cápside parcialmente formada, que es

$$A(\theta) = 2\pi R h(\theta), \quad (2.56)$$

siendo $h(\theta)$ la distancia desde el polo inferior de la cápside incompleta hasta el centro del círculo definido por el borde. Más específicamente,

$$h(\theta) = R(1 - \cos \theta), \quad (2.57)$$

lo cual es consistente con los casos límite en donde θ tiende a 0 o a π . El valor máximo para $h(\theta)$ es evidentemente $2R$, en donde se recupera el área de una esfera, *i.e.*, $A_{\text{esfera}} = 4\pi R^2$. Con estas consideraciones, se concluye que

$$n = \frac{A(\theta)}{a_1}, \quad (2.58)$$

o, de forma explícita al usar las Ecs. (2.56) y (2.54), que

$$n(\theta) = \frac{2\pi R^2(1 - \cos \theta)}{4\pi R^2/n_{\text{agr}}} = \frac{n_{\text{agr}}(1 - \cos \theta)}{2}. \quad (2.59)$$

Al combinar las Ecs. (2.55) y (2.59), es posible reescribir la longitud del borde $l(\theta)$ ahora en términos del número de subunidades n . Primero, es importante notar que, según la Ec. (2.55),

$$\sin^2 \theta = \left(\frac{l}{2\pi R} \right)^2 = 1 - \cos^2 \theta. \quad (2.60)$$

Por otro lado, a partir de la Ec. (2.59), se puede observar que

$$\cos \theta = 1 - \frac{2n(\theta)}{n_{\text{agr}}}. \quad (2.61)$$

Al combinar las dos ecuaciones anteriores y realizar un pequeño reordenamiento, se obtiene lo siguiente:

$$l(n) = \frac{4\pi R}{n_{\text{agr}}} \sqrt{n(n_{\text{agr}} - n)} = \frac{\lambda}{\tau_\lambda} \sqrt{n(n_{\text{agr}} - n)}. \quad (2.62)$$

en donde se ha definido

$$\lambda \equiv \frac{4\pi R \tau_\lambda}{n_{\text{agr}}}, \quad (2.63)$$

como una *constante de energía de borde* que absorbe la tensión lineal τ_λ y el factor geométrico $4\pi R/n_{\text{agr}}$. La energía de borde $\tau_\lambda l(n)$ siempre tiene un valor positivo y alcanza su punto máximo cuando se forma la mitad de la cápside, es decir, cuando $n = n_{\text{agr}}/2$. Claramente, esta energía se anula cuando $n = 0$ o $n = n_{\text{agr}}$, lo cual satisface las premisas físicas de la teoría.

Según el análisis dimensional, se anticipa que la tensión lineal τ_λ es proporcional a $\Delta g/2r_0$, en donde r_0 es el radio efectivo de una subunidad. Por lo tanto, la forma más simple de estimar la tensión lineal es [31, 33, 77, 81]

$$\tau_\lambda = -\frac{c \Delta g}{2r_0}, \quad (2.64)$$

siendo c el número de enlaces faltantes de una subunidad que se encuentra en el borde de la cápside en comparación con los enlaces que dicha subunidad tiene cuando forma parte de una cápside completamente formada. Suponiendo que las subunidades pueden ser aproximadas como discos con radio efectivo r_0 y que la superficie esférica de una cápside totalmente formada se cubre por completo de estas subunidades, entonces $n_{\text{agr}}\pi r_0^2 = 4\pi R^2$, lo que conduce a $R/r_0 = \sqrt{n_{\text{agr}}}/2$. De esta manera, al combinar las Ecs. (2.63) y (2.64), la estimación de λ es

$$\lambda = -\frac{\pi c \Delta g}{\sqrt{n_{\text{agr}}}}. \quad (2.65)$$

Ahora, asumiendo que cuando una subunidad que es colocada en el borde de la cápside esta pierde la mitad de su energía de enlace, se tiene que $c = 1/2$, y en consecuencia

$$\lambda = -\frac{\pi}{2} \frac{\Delta g}{\sqrt{n_{\text{agr}}}}. \quad (2.66)$$

A modo de ejemplo, para una cápside $T_r = 1$ de VPc formada por $n_{\text{agr}} = 60$ subunidades con una energía de enlace por subunidad promedio de $\Delta g \approx -15 k_B T$, se obtiene una estimación de $\lambda \approx 3.04 k_B T$.

En términos generales, si se considera una geometría y estructura (número T) arbitraria de las subunidades, la constante de energía de borde, λ , se puede expresar como [42]

$$\lambda = -\frac{b c \Delta g}{\sqrt{n_{\text{agr}}}}, \quad (2.67)$$

en donde b es el factor geométrico asociado con el tipo de subunidades de ensamblaje.

Si bien la estimación de τ_λ y λ permite determinar la penalización a la energía en la formación de una cápside vacía dados ciertos ingredientes experimentales como c^* y Δg , en las siguientes secciones y capítulos de la tesis se utiliza λ por cuestiones de simplicidad.

2.3.3 Energía libre de Autoensamblaje

Después de incorporar de manera explícita la longitud del borde, Ec. (2.62), en la energía libre de Gibbs propuesta inicialmente en la Ec. (2.51), se obtiene una función que depende únicamente del número instantáneo de subunidades n , *i.e.*,

$$\Delta G(n) = n\Delta\mu + \sigma_n = n\Delta\mu + \lambda\sqrt{n(n_{\text{agr}} - n)}. \quad (2.68)$$

siendo $\sigma_n = \tau_\lambda l(n) = \lambda\sqrt{n(n_{\text{agr}} - n)}$ la energía de borde. La presencia de la energía de borde es la razón por la que, aproximadamente, se ignoran las cápsides parcialmente formadas en la descripción en equilibrio, ya que el mayor coste energético hace que éstas cápsides sean fuertemente reprimidas [31]. En la Fig. 2.3, se muestran las gráficas representativas de la energía de borde $l(n)$, Ec. (2.62), y la energía libre de Gibbs, Ec. (2.68).

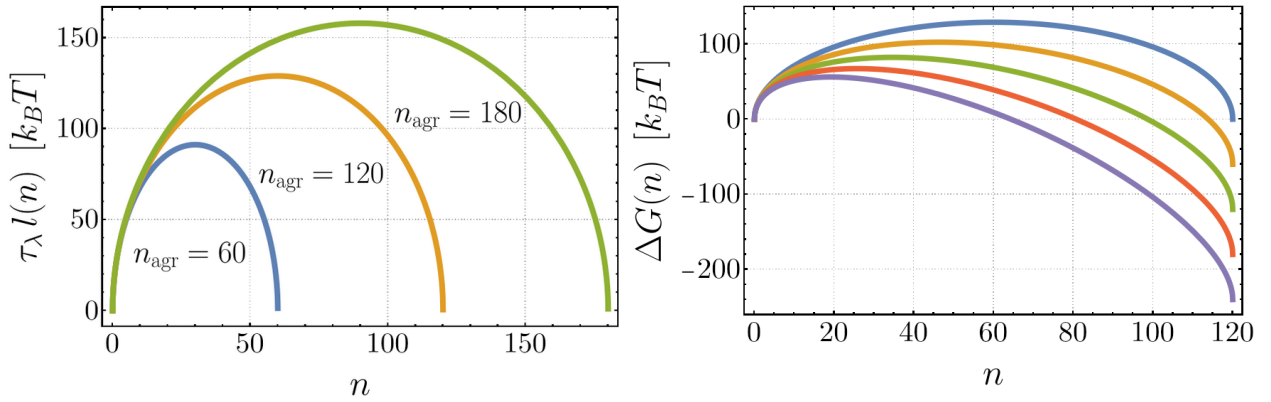


Figura 2.3: Gráficas representativas de la energía de borde y energía libre de Gibbs. La energía de borde $\tau_\lambda l(n)$ (panel izquierdo) se grafica para diferentes números de agregación n_{agr} , a saber, $n_{\text{agr}} = 60, 120$, y 180 , usando la estimación de la tensión lineal asociada a la energía de enlace por subunidad promedio $\Delta g \approx -15 k_B T$ (ver Ec. (2.66)). La energía de Gibbs $\Delta G(n)$ (panel derecho), dada por la ecuación Ec. (2.68), se traza para distintos valores de la diferencia de potencial químico, *i.e.*, $\Delta\mu = 0.0 k_B T$ (línea azul), $\Delta\mu = -0.5 k_B T$ (línea naranja), $\Delta\mu = -1.0 k_B T$ (línea verde), $\Delta\mu = -1.5 k_B T$ (línea roja), y, $\Delta\mu = -2.0 k_B T$ (línea morada), con $n_{\text{agr}} = 120$ y $\Delta g \approx -15 k_B T$.

2.3.4 La Barrera de Energía

Como se mencionó anteriormente, 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 debida a la energía asociada al borde de la cápside, $\lambda\sqrt{n(n_{\text{agr}} - n)}$. La competición de estas dos contribuciones opuestas da lugar a la barrera de energía ΔG^* . Para calcular la altura de la barrera de energía, es necesario localizar el punto en el que ΔG es máxima, es decir, n^* . A tal efecto, se introduce la *supersaturación* adimensional Γ definida como se muestra a continuación:

$$\Gamma \equiv -\frac{\Delta\mu}{\lambda}. \quad (2.69)$$

Al establecer que $(\partial\Delta G(n)/\partial n)_\beta|_{n=n^*} = 0$, donde el subíndice β indica derivación parcial a temperatura constante, y al resolver para n^* se encuentra el número crítico de agregación. Esto es,

$$\begin{aligned} \frac{1}{\lambda} \left(\frac{\partial\Delta G(n)}{\partial n} \right)_\beta \Big|_{n=n^*} &= \frac{\partial}{\partial n} \left[-n\Gamma + \sqrt{n(n_{\text{agr}} - n)} \right]_\beta \Big|_{n=n^*} \\ &= -\Gamma + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{n_{\text{agr}} - n^*}{n^*}} - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{n^*}{n_{\text{agr}} - n^*}} = 0. \end{aligned} \quad (2.70)$$

Después de manipular ligeramente la expresión anterior, se encuentra que

$$-\Gamma + \frac{1}{2} \frac{n_{\text{agr}} - 2n^*}{\sqrt{n^*(n_{\text{agr}} - n^*)}} = 0. \quad (2.71)$$

Resolviendo para n^* , se obtiene el tamaño crítico de nucleación

$$n^* = \frac{n_{\text{agr}}}{2} \left(1 - \frac{\Gamma}{\sqrt{\Gamma^2 + 1}} \right). \quad (2.72)$$

Al sustituir este resultado en la Ec. (2.68), se obtiene la altura de la barrera de energía,

$$\Delta G^* = \Delta G(n^*) = \Delta G_0^* (\sqrt{\Gamma^2 + 1} - \Gamma), \quad (2.73)$$

siendo $\Delta G_0^* \equiv n_{\text{agr}} \lambda / 2$. La gráfica de estas dos cantidades, Ecs. (2.72) y (2.73), exhibe un decaimiento monótono al incrementar la supersaturación Γ , como se muestra en la Fig. 2.4. Más aún, la barrera de energía y el número crítico de agregación se relacionan a través de la siguiente expresión:

$$\frac{\Delta G^*}{n^*} = \lambda \sqrt{\Gamma^2 + 1}, \quad (2.74)$$

lo que indica que $\Delta\mu$, o de forma equivalente que la concentración de subunidades libres c_1 (ver Ec. (2.52)), y λ son los únicos parámetros que controlan la altura de la barrera de energía y el tamaño crítico del agregado.

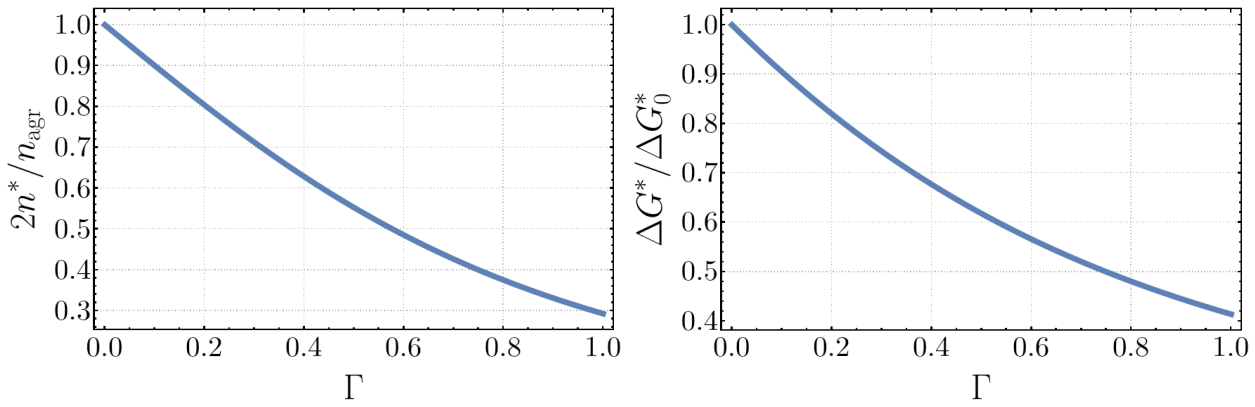


Figura 2.4: Representación gráfica del decaimiento de las Ecs. (2.72) (panel izquierdo) y (2.73) (panel derecho), en su versión adimensional, en función de la supersaturación, Γ .

En el estado de equilibrio, *i.e.*, $\Delta\mu = 0.0 k_B T$, la energía libre de los intermediarios de tamaño n está determinada por la tensión lineal (asociada al segundo término en la Ec. (2.68)). En este caso, el tamaño crítico de una cápside parcial corresponde a la mitad de la cápside completamente formada, lo que se traduce en que

$$n_{\Delta\mu=0}^* = \frac{n_{\text{agr}}}{2}, \quad (2.75)$$

y por lo tanto a

$$\Delta G_{\Delta\mu=0}^* = \frac{n_{\text{agr}}}{2} \lambda. \quad (2.76)$$

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 $1 < n < n^*$ se disolverán en subunidades libres. En contraste, los agregados que contengan $n \geq n^*$ 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 barrera de energía debida a la tensión lineal es responsable de desfavorecer los agregados intermediarios, de modo que solo se observan subunidades libres o cápsides completamente formadas en la solución. En el panel izquierdo de la Fig. 2.5, se representa esquemáticamente la altura de la barrera de energía en dos escenarios diferentes: (i) cuando $\Delta\mu = 0.0 k_B T$ ($c_1 = c^*$) y la barrera de energía está situada en construir media cápside $n_{\text{agr}}/2$, y (ii) cuando $\Delta\mu < 0$ ($c_1 < c^*$), lo que define el estado *supersaturado* del sistema. Se puede observar que cuando $\Delta\mu < 0$ la barrera de energía es menor que cuando $\Delta\mu = 0.0 k_B T$, y esta disminuye

progresivamente a medida que $\Delta\mu$ (Γ) se hace más negativo (positivo). En otras palabras, al tener una diferencia de potencial químico menor a cero, el tamaño del núcleo necesario para un ensamblaje exitoso disminuye y la barrera de energía puede ser lo suficientemente pequeña para promover el autoensamblaje de la cápside vacía.

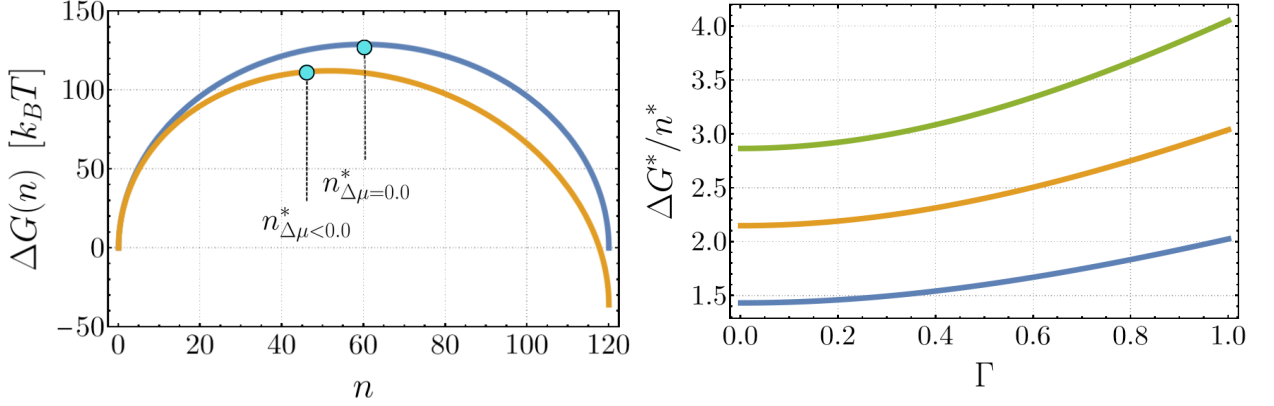


Figura 2.5: Energía libre de Gibbs en dos condiciones de autoensamblaje y la relación entre altura de la barrera de energía y el tamaño crítico de agregación. En el panel izquierdo, se muestra la Ec. (2.68) en el estado de equilibrio, *i.e.*, $\Delta\mu = 0.0 k_B T$ (línea azul) y en el estado de supersaturación, *i.e.*, $\Delta\mu < 0$ (línea naranja). El trazo de esta función se obtiene al suponer que la cápside completa contiene $n_{\text{agr}} = 120$ subunidades y que la energía de enlace por subunidad promedio es $\Delta g \approx -15 k_B T$. En el panel derecho, se ilustra el comportamiento representativo del cociente en la Ec. (2.74) para una cápside con $n_{\text{agr}} = 120$ subunidades y distintos valores de la energía de enlace por subunidad promedio, *i.e.*, $\Delta g \approx -10 k_B T$ (línea azul), $\Delta g \approx -15 k_B T$ (línea naranja) y $\Delta g \approx -20 k_B T$ (línea verde), en función de la supersaturación, Γ .

Es importante analizar el comportamiento de las ecuaciones más importantes de esta sección, *i.e.*, Ecs. (2.72) y (2.73), y su simplificación en los casos límite de supersaturación. Cerca del equilibrio, la condición sobre la Ec. (2.69) es

$$\Gamma \ll 1, \quad (2.77)$$

lo que significa que no hay una ventaja significativa en que una subunidad se coloque en un agregado o se mantenga libre en solución. Al hacer una serie de Taylor de las Ecs. (2.72) y (2.73) alrededor de $\Gamma \rightarrow 0$ y mantener los términos de primer orden, se encuentra que

$$n_{\Gamma \rightarrow 0}^* \approx \frac{n_{\text{agr}}}{2}(1 - \Gamma) \quad \text{junto con} \quad \Delta G_{\Gamma \rightarrow 0}^* \approx \Delta G_0^*(1 - \Gamma), \quad (2.78)$$

las cuales ahora se relacionan por la siguiente expresión:

$$\frac{\Delta G_{\Gamma \rightarrow 0}^*}{n_{\Gamma \rightarrow 0}^*} \approx \lambda. \quad (2.79)$$

En contraste, en el estado de alta supersaturación, la condición sobre la Ec. (2.69) se escribe como

$$\frac{1}{\Gamma} \ll 1, \quad (2.80)$$

de manera que, bajo esta consideración, las Ecs. (2.72) (2.73) y (2.74) se modifican a

$$n^* \approx \frac{n_{\text{agr}}}{4\Gamma^2} \ll 1, \quad \Delta G^* \approx \frac{\Delta G_0^*}{2\Gamma} \ll 1, \quad \text{y} \quad \frac{\Delta G^*}{n^*} \approx \Gamma \lambda, \quad (2.81)$$

respectivamente.

Por un lado, a partir de las Ecs. en (2.78) y (2.81) se puede ver que, cerca del estado de equilibrio, el tamaño crítico de agregación es grande, *i.e.*, alrededor de $n_{\text{agr}}/2$. Por otro lado, a medida que la supersaturación incrementa, el tamaño crítico se aproxima al de una subunidad individual si $\Gamma \geq \sqrt{n_{\text{agr}}}/2$. La altura de la barrera de energía también disminuye al incrementar la supersaturación hasta que se vuelve del orden de la energía térmica, en donde el proceso de nucleación dejará de ser activado y estará dominado por los efectos cinéticos.

El Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV) es un proceso cinético [31, 52]. En la siguiente sección, se aborda la cinética del autoensamblaje de una cápside vacía, a partir de la cual se deriva el ritmo de nucleación en estado estacionario J y el tiempo de nucleación τ . Todos estos elementos son conectados con la descripción termodinámica del proceso presentada en esta y secciones anteriores.

2.4 Cinética del Autoensamblaje de Cápsides Virales

En años recientes, la comunidad científica ha sido capaz de monitorear la cinética de autoensamblaje de cápsides vacías usando dispersión de luz y turbidimetría en cápsides del VHB y VPH [52]. Estos estudios experimentales revelan dos características fundamentales en la cinética de autoensamblaje: (i) Inicialmente hay un periodo de retraso (tiempo de nucleación), τ , en el que no se producen cápsides aún en las condiciones adecuadas de autoensamblaje; posteriormente, la producción de cápsides crece rápidamente siguiendo una curva sigmoideal. (ii) El desensamblaje de la cápside ocurre a condiciones de concentración diferentes que el ensamblaje, lo que lleva a un fenómeno de *histéresis*. En otras palabras, una vez que las cápsides están formadas, no se disuelven fácilmente aún si la concentración de subunidades libres cae drásticamente.

Los dos puntos anteriores tienen, por un lado, una gran relevancia biológica en el ciclo de replicación viral (véase el Capítulo 1) y por otro lado, muestran el comportamiento típico de una transición de fase de primer orden [31, 74].

El primer modelo cinético para explicar el autoensamblaje de una cápside viral fue introducido por Zlotnick y Stray [82]. Este modelo describe el proceso de formación de la cápside como una sucesión de reacciones biomoleculares concurrentes entre subunidades, agregados intermedios y cápsides completas, que constituye esencialmente al tratamiento típico de nucleación [83]. La secuencia de reacciones se representa esquemáticamente como sigue:



mientras que la población de agregados intermedios que contienen n subunidades obedece la siguiente ecuación diferencial ordinaria:

$$\frac{d[n]}{dt} = k_{\text{aso},n-1}[n-1][\text{subunidad}] + k_{\text{dis},n+1}[n+1] - k_{\text{aso},n}[n][\text{subunidad}] - k_{\text{dis},n}[n], \quad (2.83)$$

en donde k_{aso} y k_{dis} son los ritmos de asociación y disociación de subunidades en un agregado de tamaño n , respectivamente. A diferencia de la TCN, en el modelo de Zlotnick y Stray, el núcleo que contiene n^* subunidades es tratado de forma independiente con un ritmo de formación $k_{\text{aso:núcleo}} < k_{\text{aso}}$ y desensamblaje $k_{\text{dis:núcleo}} = 0$. Es decir, el núcleo es el agregado intermedio que crece a un ritmo más lento en la adición sucesiva de subunidades para formar la cápside completa, justificando el

periodo de retraso (tiempo de nucleación) τ e imponiendo que el núcleo no pueda desensamblarse.¹³ Si bien este modelo puede describir la cinética de experimentos *in vitro* de AECV vacías como las cápsides del VHB [63] también tiene algunas desventajas, *e.g.*, se requiere de un gran conjunto de ecuaciones que se debe resolver numéricamente, lo que implica un elevado costo computacional, el ritmo de reacción se debe ajustar a los datos experimentales, el tamaño del núcleo n_{agr} debe ser supuesto inicialmente, y aún más importante, se debe suponer que la energía de unión entre subunidades, $\Delta\mu$, es diferente en el ensamblaje y desensamblaje. Estas dificultades deben adaptarse para cada experimento, lo que limita el poder predictivo de la teoría. En contraste, la TCN aplicada a cápsides virales supera algunas de estas dificultades al brindar una conexión más directa entre la teoría y experimentos [31, 52] (ver Sección 2.3). Tal como se presentó anteriormente, el modelo físico de la energía libre de formación de la cápside parcialmente formada, Ec. (2.46), y por lo tanto la Ec. (2.68), depende de la energía de enlace efectiva entre subunidades, Δg , y de la concentración de subunidades libres en solución, c_1 . La energía libre de Gibbs, $\Delta G(n)$, puede ser relacionada con el ritmo de producción de cápsides, J . Este proceso se muestra con detalle en la siguiente sección.

2.4.1 Cinética de Nucleación: Un análisis general

El crecimiento de un agregado intermedio compuesto por n subunidades ocurre cuando las subunidades libres colisionan con él. En términos generales, la cantidad de subunidades libres supera considerablemente al número de agregados, de modo que las colisiones agregado-agregado son muy raras en comparación con las colisiones subunidad-agregado. Por lo tanto las colisiones agregado-agregado pueden ser despreciadas [78]. Adicionalmente, se asume que se añade una subunidad al agregado a la vez, una premisa que se respalda con el postulado de iguales probabilidades *a priori* de la construcción estadística de la teoría (ver Sección 2.2) y el modelado de la energía libre de Gibbs de autoensamblaje, ΔG , (ver Sección 2.3). De esta manera, el autoensamblaje de una cápside viral puede concebirse como una cascada de reacciones, en donde n_{agr} subunidades se unen para formar una cápside completa [42].

A continuación, se desarrollan los aspectos básicos de la teoría cinética de nucleación que son necesarios para describir la cinética del AECV. Primero se introduce un sistema multicomponente, el caso más general, en el que se considera un número arbitrario de especies de subunidades proteicas coexistiendo en la solución de autoensamblaje. Posteriormente, se obtiene la cinética unidimensional como un caso especial de dicha generalización, la cual es la formulación adecuada para el modelo de este capítulo.¹⁴

¹³Al resolver numéricamente las Ecs. (2.83) se muestra que el conjunto de reacciones alcanza rápidamente una concentración en estado estacionario de agregados intermedios que se aproxima de forma asintótica al equilibrio caracterizado por la ley de acción de masas en la Ec. (2.41), a partir de donde se obtiene la energía libre de ensamblaje de la cápside, *i.e.*, Ec. (2.46) [42].

¹⁴Durante la presentación de la TAECV, se ha supuesto que la solución acuosa de autoensamblaje contiene una sola especie de subunidades proteicas o capsómeros, *e.g.*, dímeros para el VMCC [64] o el VHB [84] y pentámeros para el VPH [50] o el VS40 [66]. La razón por la cual en esta sección se describe la cinética de un sistema multicomponente en donde se contemplan, en vez de una, l -especies de subunidades, es debido a que ésta formulación resulta útil en modelos de AECV más complejos. En el Capítulo 3, Sección 3.5, se requiere derivar la cinética de un sistema *bicomponente* para describir el autoensamblaje de una cápside esférica a partir de una sola especie de subunidades, pero con dos grados de libertad independientes, a saber, el número instantáneo de subunidades, n , y el radio instantáneo de curvatura, R . Más aún, las ideas de la cinética multicomponente podrían resultar útiles para estudiar el autoensamblaje simultaneo de capsómeros y proteínas de andamiaje, una de las posibles futuras líneas de investigación que surgen de esta tesis (véase la Sección de [Perspectivas: Futuras Líneas de Investigación](#)). Estos ejemplos demuestran que, si bien implementar la cinética multicomponente en una etapa tan temprana de la TAECV parece ser innecesario por su excesiva complejidad, finalmente resulta en una ventaja significativa que permite extender las ideas de la cinética de AECV a modelos más complejos.

Suponga que se tiene una solución acuosa en la que coexisten l diferentes tipos de subunidades proteicas o capsómeros, y en la que las fluctuaciones térmicas inducen la formación de pequeños agregados de estos elementos constitutivos. En este contexto, se podría observar un agregado de tamaño $\{n_i\} = \{n_1, n_2, n_3, \dots, n_l\}$, en donde n_i ($i = 1, 2, 3, \dots, l$) indica el número de subunidades proteicas de la especie i que conforman al agregado. Por ejemplo, un agregado de tamaño $\{2_1, 3_2, 1_3, 0_4\}$ se compone de 2 subunidades de la especie 1, 3 subunidades de la especie 2, 1 una subunidad de la especie 3 y ninguna de la especie 4. En el ámbito del AECV, este concepto podría describir, por ejemplo, la cinética formación de una cápside viral esférica que se autoensambla a partir dos tipos de capsómeros, *i.e.*, pentámeros y hexámeros. En este caso, el tamaño de una cápside parcial puede escribirse como $\{n_{\text{pent}}, n_{\text{hex}}\}$, en donde la primera entrada indica el número de pentámeros ($0 < n_{\text{pent}} < 12$) y la segunda el número de hexámeros ($0 < n_{\text{hex}} < 10(T - 1)$); en donde T es el número de triangulación [5] en un agregado intermedio.

Retomando el análisis del caso general de la cinética de autoensamblaje. Suponga que el ritmo al que las subunidades de la especie k colisionan con los agregados de tamaño $\{n_i\} = \{n_1, n_2, n_3, \dots, n_k, \dots, n_l\}$, también llamado el ritmo de unión, es $\beta_k \{n_i\}(t)$, mientras que dichos agregados de tamaño $\{n_i\}$ pierden una subunidad del tipo k al ritmo de separación $\gamma_k \{n_i\}(t)$. Por conveniencia, se separa el número de subunidades de la especie k , que se unen o desprenden de una cápside parcial, de todos los otros tipos de subunidades $j \neq k$ al escribir $\{n_i\} \equiv \{n_j, n_k\}$. En la Fig. 2.6 se proporciona una representación esquemática del flujo de subunidades entre dos tamaños de agregados en la dirección de la componente k .

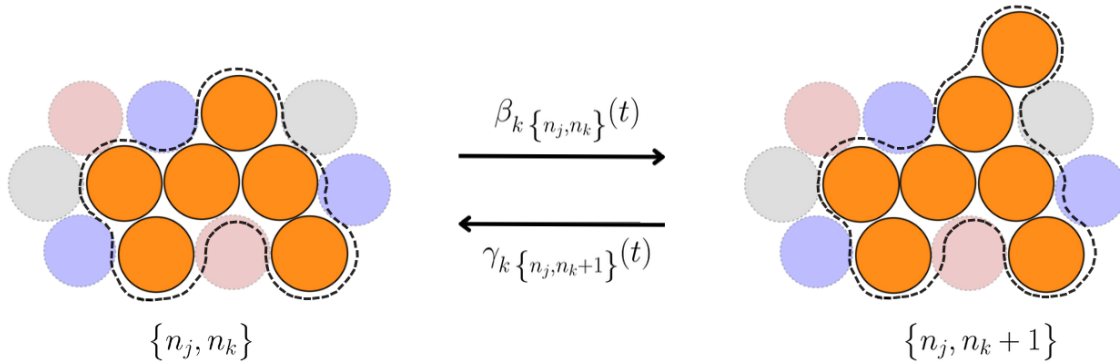


Figura 2.6: Flujo de subunidades de la especie k (círculos en color naranja) entre dos tamaños de agregados intermedios. El ritmo de unión y separación está dado por $\beta_k \{n_j, n_k\}(t)$ y $\gamma_k \{n_j, n_k\}(t)$, respectivamente. De lado izquierdo, se tiene un agregado de tamaño $\{n_j, n_k\}$, mientras que de lado derecho se representa un agregado de tamaño $\{n_j, n_k + 1\}$, que tiene una subunidad más (círculo en color naranja) de la especie k que el original (izquierda). El número de subunidades proteicas de la especie j ($j \neq k$), n_j , se mantiene constante (círculos tenues en color gris, azul y rojo).

La concentración de los agregados de tamaño $\{n_j, n_k\}$, $c_{\{n_j, n_k\}}(t)$, cambia en la dirección k según los siguientes procesos: Un agregado de tamaño $\{n_j, n_k\}$ puede convertirse en un agregado intermedio de tamaño $\{n_j, n_k - 1\}$ o $\{n_j, n_k + 1\}$ al perder o ganar una subunidad de la especie k , respectivamente. Además, se puede obtener un agregado de tamaño $\{n_j, n_k\}$ al añadir o sustraer una subunidad de la especie k de un agregado de tamaño $\{n_j, n_k - 1\}$ o $\{n_j, n_k + 1\}$, respectivamente. En consecuencia, se puede deducir que el cambio en el tiempo de la población, o concentración, de los agregados de tamaño $\{n_j, n_k\}$ está controlado por la siguiente *ecuación maestra*:

$$\begin{aligned} \frac{d c_{\{n_j, n_k\}}(t)}{dt} = \sum_{k=1}^l \left[\beta_{k \{n_j, n_k-1\}}(t) c_{\{n_j, n_k-1\}}(t) - \beta_{k \{n_j, n_k\}}(t) c_{\{n_j, n_k\}}(t) \right. \\ \left. - \gamma_{k \{n_j, n_k\}}(t) c_{\{n_j, n_k\}}(t) + \gamma_{k \{n_j, n_k+1\}}(t) c_{\{n_j, n_k+1\}}(t) \right]. \end{aligned} \quad (2.84)$$

En la ecuación anterior, las contribuciones para la *creación* y *aniquilación* del agregado de tamaño $\{n_j, n_k\}$ corresponden al primer y cuarto término, y el segundo y tercer término, respectivamente. Adicionalmente, la corriente neta de agregados de tamaño $\{n_j, n_k\}$ en la dirección k que crecen hacia $\{n_j, n_k + 1\}$, se define como

$$I_{k \{n_j, n_k+1\}}(t) \equiv \beta_{k \{n_j, n_k\}}(t) c_{\{n_j, n_k\}}(t) - \gamma_{k \{n_j, n_k+1\}}(t) c_{\{n_j, n_k+1\}}(t). \quad (2.85)$$

Con esta definición, la ecuación maestra se simplifica a

$$\frac{d c_{\{n_j, n_k\}}(t)}{dt} = \sum_{k=1}^l \left[I_{k \{n_j, n_k-1\}}(t) - I_{k \{n_j, n_k\}}(t) \right]. \quad (2.86)$$

El conjunto de ecuaciones recién obtenidas se pueden resolver, al menos numéricamente, si se conocen los ritmos de unión, $\beta_{k \{n_j, n_k\}}(t)$, y separación, $\gamma_{k \{n_j, n_k+1\}}(t)$. El ritmo $\gamma_{k \{n_j, n_k+1\}}(t)$ se puede calcular usando la consideración del equilibrio local. En el equilibrio, las concentraciones se mantienen constantes, lo que significa que

$$\frac{d c_{\{n_j, n_k\}}^{\text{eq}}(t)}{dt} = 0. \quad (2.87)$$

Aunado a esto, en el equilibrio, la corriente en el sistema es cero, *i.e.*, no hay crecimiento ni disociación de agregados, lo que significa que se tiene un *balance detallado*. Esto se traduce a que el ritmo de cada proceso, ya sea de unión o separación, debe ser equivalente a su proceso inverso. Matemáticamente, esto es

$$\gamma_{k \{n_j, n_k+1\}} c_{\{n_j, n_k+1\}}^{\text{eq}} = \beta_{k \{n_j, n_k\}} c_{\{n_j, n_k\}}^{\text{eq}}. \quad (2.88)$$

Asumiendo que los coeficientes de separación son independientes de las subunidades en la solución, $\gamma_{k \{n_j, n_k+1\}}$ se calcula como se muestra a continuación [78, 85]

$$\gamma_{k \{n_j, n_k+1\}} = \beta_{k \{n_j, n_k\}} \frac{c_{\{n_j, n_k\}}^{\text{eq}}}{c_{\{n_j, n_k+1\}}^{\text{eq}}}. \quad (2.89)$$

En la teoría aplicada a cápsides virales, se asume que las subunidades libres en la solución se comportan como un gas ideal, de modo que sus concentraciones son directamente proporcionales a sus presiones. Este argumento también hace válida la formulación estadística de la Sección 2.2.

2.4.2 Cinética de Autoensamblaje de Cápsides Virales

El proceso de AECV es considerado como una serie de reacciones unimoleculares en donde la unión o separación de una subunidad proteica promueve el crecimiento o decaimiento de una cápside parcialmente formada. Estas consideraciones físicas se expresan formalmente como sigue [42]:

$$c_n(t) \xrightleftharpoons[\gamma_{n+1}(t)]{\beta_n(t)} c_{n+1}(t). \quad (2.90)$$

Debido a que se trata de un sistema de una componente, $l = 1$, de modo que el subíndice en las expresiones correspondientes a este sistema, así como la separación del número de subunidades $\{N_i, N_k\}$, no es necesaria. Así, se reconoce que $\{n_i\} = n$ y $c_{\{n_i\}}(t) = c_n(t)$, en donde, al igual que en secciones anteriores, el número n indica el número instantáneo de subunidades en un agregado. Bajo estas consideraciones, la ecuación maestra, Ec. (2.84), se simplifica a

$$\frac{d c_n(t)}{dt} = \beta_{n-1}(t) c_{n-1}(t) - \beta_n(t) c_n(t) - \gamma_n(t) c_n(t) + \gamma_{n+1}(t) c_{n+1}(t), \quad (2.91)$$

la cual, debido a que la corriente neta de cápsides parcialmente formadas de tamaño n que crecen a tamaño $n + 1$, Ec. (2.85), se transforma a

$$I_n(t) = \beta_n(t) c_n(t) - \gamma_{n+1} c_{n+1}(t), \quad (2.92)$$

también puede escribirse como¹⁵

$$\frac{d c_n(t)}{dt} = I_{n-1}(t) - I_n(t), \quad (2.93)$$

una ecuación que aplica para $n = 1$ hasta $n = n_{\text{agr}}$ con las condiciones $\beta_{n_{\text{agr}}} = 0$ y $\gamma_1(t) = 0$. Es decir, una cápside completamente formada no puede crecer más y por lo tanto es el último paso de la reacción en la Ec. (2.90), mientras que una subunidad es la unidad fundamental de construcción de agregados y no puede subdividirse ni perder elementos. El objetivo de esta sección es encontrar el *ritmo de nucleación* estacionario, J . Una vez más, al resolver la ecuación maestra, se obtienen las poblaciones de subunidades, agregados intermedios y cápsides completamente formadas. Sin embargo, para llevar a cabo este proceso, se requiere conocer los ritmos de unión, $\beta_n(t)$, y separación, $\gamma_n(t)$, para todos los tamaños. Por un lado, el ritmo de unión, $\beta_n(t)$, puede ser modelado para el caso de subunidades proteicas en una solución acuosa usando la teoría de agregación de Smoluchowski, *i.e.*, [42, 87]

$$\beta_n(t) = b c_1(t) D_1 r_n, \quad (2.94)$$

siendo b una corrección geométrica, D_1 el coeficiente de difusión las subunidades libres y r_n el radio instantáneo del borde en una cápside parcialmente formada.

Resulta fundamental observar que la concentración de subunidades libres $c_1(t)$ generalmente cambia durante el proceso de autoensamblaje, de modo que el ritmo de unión $\beta_n(t)$ depende del tiempo en cualquiera de los modelos anteriores. Sin embargo, si la barrera de nucleación es alta comparada con $k_B T$, el ritmo de formación de cápsides es un evento raro, de manera que la reducción en la concentración de subunidades libres es pequeña y se puede aproximar como constante. Por otro lado, al considerar la ecuación maestra, Ec. (2.91), en condiciones de equilibrio, y usando la Ec. (2.89), se obtiene

$$\gamma_{n+1} = \beta_n \frac{c_n^{\text{eq}}}{c_{n+1}^{\text{eq}}}, \quad (2.95)$$

que es la condición de balance detallado. La concentración en equilibrio c_n^{eq} debe seguir la distribución de Boltzmann. De manera que, usando la Ec. (2.45), se escribe

¹⁵El conjunto de ecuaciones maestras representado en la Ec. (2.93) fue inicialmente introducido por R. Becker y W. Döring [86], y son conocidas desde entonces como ecuaciones tipo Becker-Döring.

$$\gamma_{n+1} = \beta_n \exp \{-\beta[\Delta G(n+1) - \Delta G(n)]\}, \quad (2.96)$$

i.e., una expresión en la que se ha cancelado la concentración del estado de referencia c_s y en donde $\Delta G(n)$ es la energía libre de formación de una cápside parcialmente formada que contiene n subunidades, Ec. (2.51).¹⁶

Usando la condición de balance detallado, Ec. (2.95), se puede escribir la corriente $I_n(t)$ de la Ec. (2.92) (equivalente al flujo $J_n(t)$ en el caso de un sistema con una componente), como

$$J_n = \beta_n c_n^{\text{eq}} \left[\frac{\beta_n(t)}{\beta_n} \frac{c_n(t)}{c_n^{\text{eq}}} - \frac{c_{n+1}(t)}{c_{n+1}^{\text{eq}}} \right]. \quad (2.97)$$

El coeficiente de unión $\beta_n(t)$ es proporcional a la concentración de subunidades en nucleación, mientras que β_n es proporcional a la concentración de subunidades en equilibrio. De manera que para una sustancia de una componente $\beta_n(t) = \beta_n$. Por lo tanto,

$$J_n = \beta_n c_n^{\text{eq}} \left[\frac{c_n(t)}{c_n^{\text{eq}}} - \frac{c_{n+1}(t)}{c_{n+1}^{\text{eq}}} \right]. \quad (2.98)$$

La ecuación anterior puede reorganizarse para expresarse como sigue:

$$\frac{J_n(t)}{\beta_n c_n^{\text{eq}}} = \frac{c_n(t)}{c_n^{\text{eq}}} - \frac{c_{n+1}(t)}{c_{n+1}^{\text{eq}}}. \quad (2.99)$$

La suma de las Ecs. (2.99) con $n = 1, 2, 3, \dots, n_{\text{agr}} - 1$ (véase la Ec. (2.93)), es

$$\begin{aligned} \sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}-1} \frac{J_n(t)}{\beta_n c_n^{\text{eq}}} &= \frac{J_1(t)}{\beta_1 c_1^{\text{eq}}} + \frac{J_2(t)}{\beta_2 c_2^{\text{eq}}} + \dots + \frac{J_{n-2}(t)}{\beta_{n-2} c_{n-2}^{\text{eq}}} + \frac{J_{n-1}(t)}{\beta_{n-1} c_{n-1}^{\text{eq}}} \\ &= \left(\frac{c_1(t)}{c_1^{\text{eq}}} - \frac{c_2(t)}{c_2^{\text{eq}}} \right) + \left(\frac{c_2(t)}{c_2^{\text{eq}}} - \frac{c_3(t)}{c_3^{\text{eq}}} \right) + \dots + \left(\frac{c_{n_{\text{agr}}-2}(t)}{c_{n_{\text{agr}}-2}^{\text{eq}}} - \frac{c_{n_{\text{agr}}-1}(t)}{c_{n_{\text{agr}}-1}^{\text{eq}}} \right) \\ &\quad + \left(\frac{c_{n_{\text{agr}}-1}(t)}{c_{n_{\text{agr}}-1}^{\text{eq}}} - \frac{c_{n_{\text{agr}}}(t)}{c_{n_{\text{agr}}}^{\text{eq}}} \right). \end{aligned} \quad (2.100)$$

El segundo término de cada una de las contribuciones entre paréntesis se cancela con el primer término de la siguiente contribución, con lo que la serie telescópica se puede escribir de la siguiente manera:

$$\sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}-1} \frac{J_n(t)}{\beta_n c_n^{\text{eq}}} = \frac{c_1(t)}{c_1^{\text{eq}}} - \frac{c_{n_{\text{agr}}}(t)}{c_{n_{\text{agr}}}^{\text{eq}}}. \quad (2.101)$$

De acuerdo con la ecuación anterior, el ritmo de nucleación, *i.e.*, el ritmo de la formación de cápsides virales, depende de las condiciones a la frontera que están asociadas a la concentración de subunidades libres en la solución y de cápsides completamente formadas.

¹⁶Es importante notar que la diferencia de energía en el argumento de la exponencial de la Ec. (2.96) proporciona un término que va como $1/c_1$, el cual se cancela con el factor c_1 de β_n en la Ec. (2.94). Por lo tanto, el ritmo de separación es independiente de la concentración de subunidades libres, corroborando la suposición hecha al escribir la Ec. (2.89).

2.4.3 Ritmo de Nucleación J en el Estado Estacionario

En el estado estacionario la concentración de agregados no cambia, *i.e.*, $dc_n(t)/dt = 0$, lo que implica que la transformación de cápsides parcialmente formadas de tamaño $(n - 1)$ a agregados con n subunidades es independiente de n , por lo que

$$J_{n-1} = J_n = J_{n+1} \equiv J. \quad (2.102)$$

La ecuación anterior define el ritmo de nucleación en el estado estacionario J . Particularmente, usando la Ec. (2.101) se obtiene

$$J \left(\sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}-1} \frac{1}{\beta_n c_n^{\text{eq}}} \right) = \left(\frac{c_1(t)}{c_1^{\text{eq}}} - \frac{c_{n_{\text{agr}}}(t)}{c_{n_{\text{agr}}}^{\text{eq}}} \right). \quad (2.103)$$

Más aún, para alcanzar el estado estacionario con una corriente finita J , se requiere de una concentración de subunidades libres fijada al valor en el equilibrio, a saber, $c_1(t)/c_1^{\text{eq}} = 1$, y una concentración muy pequeña de cápsides completamente formadas, *i.e.*, $c_{n_{\text{agr}}}(t)/c_{n_{\text{agr}}}^{\text{eq}} \approx 0$. En otras palabras, se necesita una fuente de subunidades libres o que la formación de cápsides completas no disminuya significativamente la concentración c_1 . Una forma de mantener esta situación es que se remuevan las cápsides completas de la solución y devolver las subunidades individuales utilizadas al sistema. Esta aproximación es válida para el inicio del autoensamblaje, ya que la producción de cápsides es baja inicialmente [31, 52]. En virtud de estas consideraciones, la Ec. (2.103) toma la forma general del ritmo de nucleación en el estado estacionario [77, 78, 80, 85, 88]

$$J = \left(\sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}-1} \frac{1}{\beta_n c_n^{\text{eq}}} \right)^{-1}. \quad (2.104)$$

La suma de la ecuación anterior se puede calcular de forma precisa. Sin embargo, el tratamiento típico es utilizar el límite continuo y calcular dicha suma como una integral. Esto es

$$J = \left(\int_1^{n_{\text{agr}}-1} \frac{1}{\beta_n c_n^{\text{eq}}} dn \right)^{-1}. \quad (2.105)$$

Al sustituir la Ec. (2.45) en la relación anterior, el inverso del ritmo de nucleación se presenta como

$$J = c_s \left\{ \int_1^{n_{\text{agr}}-1} \frac{\exp[\beta \Delta G(n)]}{\beta_n} dn \right\}^{-1}. \quad (2.106)$$

El comportamiento de $\Delta G(n)$ y de $\exp[\beta \Delta G(n)]$ como función de n se muestra en la Fig. 2.7. Ambas expresiones tienen un máximo en el tamaño crítico de subunidades n^* , pero el máximo de $\exp[\beta \Delta G(n)]$ es mucho más pronunciado. Debido a esto, únicamente la región alrededor del tamaño crítico n^* contribuye a la integral. Esto permite (i) reescribir los límites de la integral en el dominio $(-\infty, \infty)$, ya que la integral es muy cercana a cero para valores grandes y pequeños de n , y (ii) aproximar el integrando para valores cercanos a n^* . Así que, al desarrollar la serie de Taylor de $\Delta G(n)$ alrededor de n^* se encuentra

$$\begin{aligned} \Delta G(n) &\approx \Delta G(n^*) + \left(\frac{\partial \Delta G(n)}{\partial n} \right)_{n=n^*} + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \Delta G(n)}{\partial n^2} \right)_{n=n^*} (n - n^*)^2 + \dots \\ &\approx \Delta G^* + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \Delta G(n)}{\partial n^2} \right)_{n=n^*} (n - n^*)^2 + \dots \end{aligned} \quad (2.107)$$

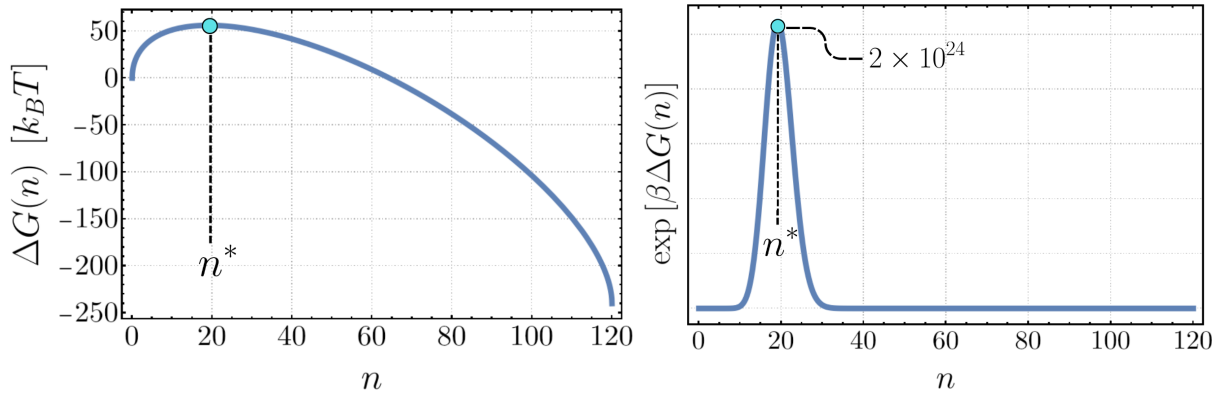


Figura 2.7: Gráficas representativas de $\Delta G(n)$ (panel izquierdo) y $\exp[\beta\Delta G(n)]$ (panel derecho) en función del número de subunidades en un agregado n . Se emplearon los valores $\Delta\mu = -2.0 k_B T$, $n_{\text{agr}} = 120$ y $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ para la construcción de las curvas.

en donde el segundo término de la expansión en serie es cero (véase la Ec. (2.70)). Asimismo, al aproximar el ritmo de unión al núcleo crítico como

$$\beta_n \approx \beta_{n^*} \equiv \beta_n^*, \quad (2.108)$$

e incluir los dos resultados anteriores en la Ec. (2.106), se obtiene lo siguiente:

$$J = c_s \beta_n^* \exp(-\beta\Delta G^*) \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} \exp \left[\frac{\beta}{2} \left(\frac{\partial^2 \Delta G(n)}{\partial n^2} \right)_{n=n^*} (n - n^*)^2 \right] dn \right\}^{-1}. \quad (2.109)$$

Al definir

$$-W^* \equiv \left(\frac{\partial^2 \Delta G(n)}{\partial n^2} \right)_{n=n^*} < 0, \quad (2.110)$$

usar el cambio de variable $x = n - n^*$ y, sabiendo que,

$$\int_{-\infty}^{\infty} e^{-ax^2} dx = \sqrt{\frac{\pi}{a}}, \quad \text{para } a > 0, \quad (2.111)$$

la integral de la Ec. (2.109) resulta en

$$\int_{-\infty}^{\infty} \exp \left(\frac{-\beta W^*}{2} x^2 \right) dx = \sqrt{\frac{2\pi}{\beta W^*}}. \quad (2.112)$$

Finalmente, considerando los resultados anteriores, el ritmo de nucleación o ritmo de formación de la cápside, *i.e.*, número de cápsides formadas, por unidad de volumen por unidad de tiempo, en el estado estacionario, es

$$J = c_s \beta_n^* Z \exp(-\beta\Delta G^*). \quad (2.113)$$

siendo

$$Z = \sqrt{\frac{\beta W^*}{2\pi}} = \sqrt{\frac{W^*}{2\pi k_B T}}, \quad (2.114)$$

el factor de Zeldovich. El factor de Zeldovich es una pequeña corrección adimensional que surge de la Ec. (2.107) y que representa la posibilidad de las cápsides parcialmente formadas de tamaño

n^* de cruzar la barrera de energía en el sentido contrario (de derecha a izquierda) al de ensamblaje y disolverse en subunidades de construcción. De las ecuaciones anteriores, se puede ver que mientras más grande sea la barrera de energía, ΔG^* , menor será el ritmo de nucleación. La dependencia que tiene J con la barrera de energía es fuerte porque ΔG^* está en el exponente.¹⁷ De esta manera, el AECV es referido como un proceso activado en donde la altura de la barrera de energía controla exponencialmente la velocidad de formación de cápsides. Adicionalmente, dado que $\Delta\mu$ depende de la concentración de subunidades libres, Ec. (2.52), es posible reducir la altura de ΔG^* al incrementar la concentración c_1 en la solución, tal como se muestra en las Figs. 2.3 y 2.5.

El factor de Zeldovich puede escribirse explícitamente en función de n_{agr} y la supersaturación, Γ , usando el resultado de $(\partial\Delta G(n)/\partial n)_{\beta}/\lambda$ en la Ec. (2.70). La segunda derivada de la energía libre respecto a n es

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial n^2}(\beta\Delta G)\right)_{\beta, n=n^*} = \frac{\partial}{\partial n} \left(-\Gamma + \frac{1}{2} \frac{n_{\text{agr}} - 2n^*}{\sqrt{n^*(n_{\text{agr}} - n^*)}} \right)_{\beta, n=n^*} \beta\lambda = -\frac{n_{\text{agr}}^2\beta\lambda}{4[n^*(n_{\text{agr}} - n^*)]^{3/2}}. \quad (2.115)$$

Al sustituir la Ec. (2.72) en la ecuación anterior, se consigue

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial n^2}(\beta\Delta G)\right)_{\beta, n=n^*} = -\frac{n_{\text{agr}}^2\beta\lambda}{4[n^*(n_{\text{agr}} - n^*)]^{3/2}} = -\frac{2(\Gamma^2 + 1)^{3/2}}{n_{\text{agr}}} \beta\lambda. \quad (2.116)$$

Por último, al implementar el resultado previo en la Ec. (2.114), se obtiene

$$Z = \sqrt{\frac{\beta\lambda}{\pi n_{\text{agr}}}} (\Gamma^2 + 1)^{3/4}. \quad (2.117)$$

Usando esta expresión, junto con la Ec. (2.73), se puede escribir el ritmo de nucleación J como una función de la supersaturación y los parámetros n_{agr} y Δg , *i.e.*,

$$J = c_s \beta_n^* Z_0 (\Gamma^2 + 1)^{3/4} \exp\left[-\beta\Delta G_0^* (\sqrt{\Gamma^2 + 1} - \Gamma)\right], \quad (2.118)$$

siendo $Z_0 \equiv \sqrt{\beta\lambda/\pi n_{\text{agr}}}$. Las predicciones del ritmo de nucleación (panel izquierdo) y el factor de Zeldovich (panel derecho) se trazan en la Fig. 2.8, en donde se aprecia que J incrementa a medida que la supersaturación crece, lo que concuerda con las observaciones experimentales y resultados numéricos [53, 62]. Por su lado, el factor de Zeldovich (panel derecho) también incrementa en respuesta al aumento en la supersaturación, pero en mucha menor medida, lo que significa que aumenta la capacidad de un agregado de tamaño crítico n^* de disolverse en subunidades al cruzar la barrera en el sentido inverso al de ensamblaje (de derecha a izquierda).

Cabe mencionar que, incluso en condiciones de supersaturación en las que la formación de cápsides es factible, el AECV vacías no se inicia de forma inmediata. En sus etapas iniciales, el sistema necesita un cierto tiempo τ para alcanzar el ritmo de nucleación estado estacionario. Este tiempo de retraso puede estimarse como [31, 77, 83, 88]

$$\tau = \frac{1}{4\pi\beta_* Z^2}, \quad (2.119)$$

que, como se puede ver de la ecuación anterior, depende inversamente del ritmo de unión crítico β_n^* , Ec. (2.108), y el factor de Zeldovich Z .

¹⁷En la TCN, el factor β_n^* está relacionado con (i) la frecuencia de salto o frecuencia de transición, la cual es una función de la difusión de subunidades libres [31, 77] y (ii) con la tasa de colisiones de monómeros de gas con la superficie de un agregado [85].

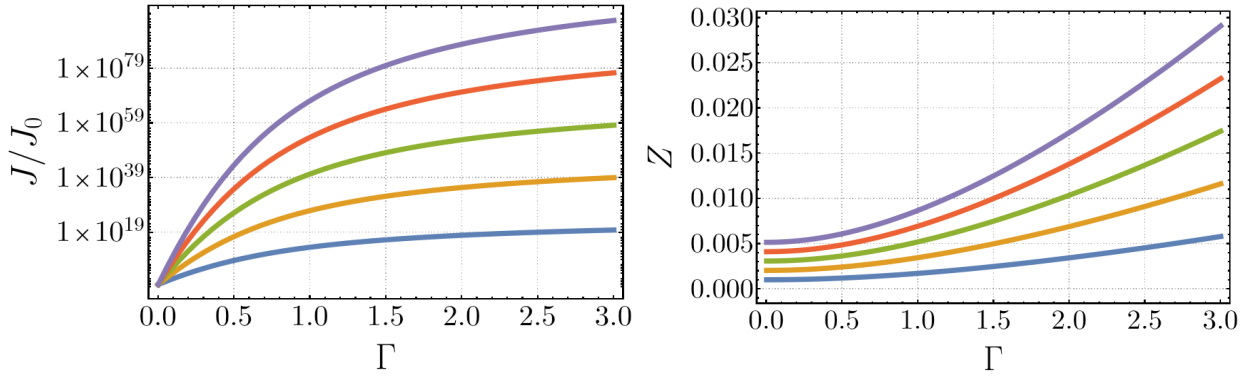


Figura 2.8: Ritmo de nucleación, J , y factor de Zeldovich, Z . En el panel izquierdo, se grafica el ritmo de nucleación, Ec. (2.118) (escalado por su valor mínimo, *i.e.*, $J_0 \equiv J_{\Gamma=0.0}$) en función de la supersaturación, Γ . En el panel derecho, se muestra el comportamiento del factor de Zeldovich, Ec. (2.117) al incrementar Γ . Las dos gráficas se obtuvieron con $n_{\text{agr}} = 180$, y para distintos valores de la energía de enlace efectiva Δg (ver Ec. (2.66)), *i.e.*, $\Delta g \approx -5.0 k_B T$ (línea azul), $\Delta g \approx -10.0 k_B T$ (línea naranja) y $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ (línea verde), $\Delta g \approx -20.0 k_B T$ (línea roja), y $\Delta g \approx -25.0 k_B T$ (línea morada).

2.5 Desensamblaje de Cápsides Virales

En las secciones anteriores, el análisis del sistema comienza cuando se tiene cierta concentración c_1 de subunidades proteicas libres en solución que, debido a la energía libre de unión, se unen para formar núcleos con n^* subunidades, los cuales crecen para construir una cápside cerrada. En contraste, en el *desensamblaje* de cápsides virales, inicialmente se tienen únicamente cápsides completas y se analiza cómo éstas se desintegran en subunidades libres.

El desensamblaje de cápsides virales ocurre en condiciones diferentes al autoensamblaje [31, 52, 75, 89]. El diferente comportamiento en ambas situaciones es lo que se denomina histéresis en ciclo de replicación viral: la disociación de las cápsides requiere saltar la barrera de energía libre en la dirección opuesta al ensamblaje (de derecha a izquierda en las Figs. 2.5 y 2.7), mientras que el formalismo matemático para describir el desensamblaje es análogo al de las Secciones 2.3 y 2.4.

2.5.1 La Barrera de Energía

La mayoría de la teoría termodinámica y cinética desarrollada anteriormente es válida para describir el desensamblaje de cápsides virales: Considere un sistema en el que inicialmente solo se tienen cápsides formadas con n_{agr} subunidades. Si la concentración total de subunidades en el sistema es c , entonces la concentración de cápsides completas $c_{n_{\text{agr}}}$ al tiempo $t = 0$ está dada por

$$c_{n_{\text{agr}}}(t = 0) = \frac{c}{n_{\text{agr}}}. \quad (2.120)$$

En este escenario, la altura de la barrera de energía de desensamblaje es¹⁸

¹⁸En la Fig. 2.5 (panel izquierdo) se proporcionan las curvas representativas de energía libre de AECV. El ensamblaje termina cuando $n_{\text{agr}} = 120$, que corresponde al punto de partida para el desensamblaje. Particularmente, la curva naranja describe el proceso en el estado de supersaturación $\Delta\mu < 0$. En esta curva se puede apreciar que la energía libre del sistema es diferente cuando $n = 0$ y cuando $n = n_{\text{agr}}$, de ahí la estructura de la Ec. (2.121). Este comportamiento también es evidente en las Figs. 2.3 (panel derecho) y 2.7 (panel izquierdo).

$$\Delta G_{\text{des}}^* = \Delta G^* - \Delta G(n_{\text{agr}}), \quad (2.121)$$

que, usando las Ecs. (2.68), (2.69) y (2.73), se puede escribir como

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{des}}^* &= \Delta G_0^* (\sqrt{\Gamma^2 + 1} - \Gamma) - n_{\text{agr}} \Delta \mu = \frac{n_{\text{agr}}}{2} (\sqrt{\Delta \mu^2 + \lambda^2} - \Delta \mu) \\ &= \Delta G_0^* (\sqrt{\Gamma^2 + 1} + \Gamma). \end{aligned} \quad (2.122)$$

A diferencia de la Ec. (2.73), para disminuir la altura de la barrera de energía que se requiere para inducir el desensamblaje se requieren condiciones de subsaturación, *i.e.* En otras palabras, un autoensamblaje exitoso requiere de $\Delta \mu < 0$, *i.e.*, una concentración de subunidades libres mucho más grande que c^* , pero para el desensamblaje la concentración de subunidades libres debe cumplir con que $c_1 \ll c^*$, que corresponde a $\Delta \mu > 0$. En la Fig. 2.9 (panel izquierdo), se muestran las curvas representativas de la Ec. (2.122) escalada en función supersaturación, Γ .

2.5.2 Ritmo de Desensamblaje J_{des} en el Estado Estacionario

La ecuación maestra, Ec. (2.91), también puede describir el proceso de desensamblaje de cápsides virales con las condiciones de frontera adecuadas. Por cuestiones de simplicidad, se considera también el estado estacionario del sistema. Debido a que el desensamblaje es posible solamente bajo la condición de que la concentración de cápsides en la solución es mucho más grande que en el equilibrio, las condiciones a la frontera son las inversas a las expuestas en la Sección 2.4.2, a saber $c_1(t)/c^{\text{eq}} = 0$ y $c_{\text{agr}}/c_{\text{agr}}^{\text{eq}} \gg 1$. Usando estos argumentos, la Ec. (2.103) se modifica a

$$J_{\text{des}} \approx -\frac{c_{n_{\text{agr}}}}{c_{n_{\text{agr}}}^{\text{eq}}} \left(\sum_{n=1}^{n_{\text{agr}}-1} \frac{1}{\beta_n c_n^{\text{eq}}} \right)^{-1} \approx -\frac{c_{n_{\text{agr}}}}{c_{n_{\text{agr}}}^{\text{eq}}} \left(\int_1^{n_{\text{agr}}-1} \frac{1}{\beta_n c_n^{\text{eq}}} dn \right)^{-1} \quad (2.123)$$

en donde, una vez más, se ha utilizado el límite continuo. Ahora, al implementar la distribución de Boltzmann para c_n^{eq} de la Ec. (2.45) se obtiene

$$J_{\text{des}} \approx -c_{n_{\text{agr}}} \left(\int_1^{n_{\text{agr}}-1} \frac{\exp[\beta \Delta G_{\text{des}}(n)]}{\beta_n} dn \right)^{-1}, \quad (2.124)$$

siendo $\Delta G_{\text{des}}(n) = \Delta G(n) - \Delta G(n_{\text{agr}})$. A partir de este punto, el proceso matemático es idéntico al que se presenta de la Ec. (2.106) a la Ec. (2.113). Esto da como resultado el ritmo de desensamblaje, *i.e.*, el número de cápsides que se desensamblan por unidad de volumen por unidad de tiempo, a saber,

$$J_{\text{des}} \approx -c_{n_{\text{agr}}} \beta_n^* Z \exp(-\beta \Delta G_{\text{des}}^*), \quad (2.125)$$

en donde el factor de Zeldovich Z es el mismo que el de la Ec. (2.114), ya que $(\partial^2 G(n)/\partial n^2)_{n=n^*} = (\partial^2 G_{\text{des}}(n)/\partial n^2)_{n=n^*}$. El signo menos en la ecuación anterior indica la desaparición de las cápsides completamente formadas. En la Fig. 2.9 (panel derecho) se trazan las curvas representativas de la Ec. (2.125).

En la siguiente sección se demuestra uno de los teoremas de nucleación, el cual relaciona el tamaño crítico del núcleo n^* , la altura de la barrera de energía, ΔG^* , y el ritmo de nucleación, J .

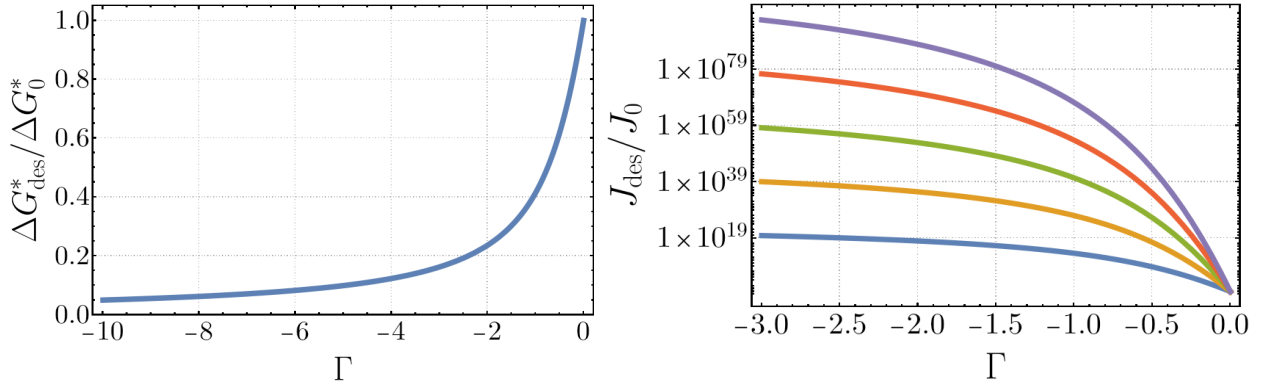


Figura 2.9: Representación gráfica del comportamiento de las Ecs. (2.122) (panel izquierdo) y (2.125) (panel derecho), en su versión adimensional, en función de la supersaturación Γ . Las curvas de J_{des}/J_0 se obtuvieron con $n_{\text{agr}} = 180$, y para distintos valores de la energía de enlace efectiva Δg (ver Ec. (2.66)), *i.e.*, $\Delta g \approx -5.0 k_B T$ (línea azul), $\Delta g \approx -10.0 k_B T$ (línea naranja) y $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ (línea verde), $\Delta g \approx -20.0 k_B T$ (línea roja), y $\Delta g \approx -25.0 k_B T$ (línea morada).

2.6 El Teorema de Nucleación

En el contexto de la TCN, el teorema de nucleación es una relación general entre el trabajo de nucleación, $\Delta G(n)$, el tamaño del núcleo crítico, n^* , y la supersaturación, Γ . El teorema aparece en diferentes formas, dependiendo no sólo del conjunto elegido de variables independientes que describen el trabajo de nucleación, sino también de cuál de estas variables cambia mientras las demás se mantienen fijas [90]. En 1982, Kashchiev dio una derivación general fenomenológica de esta relación y se refirió a esta como *teorema*, para después discutir las aplicaciones experimentales [91]. Sin embargo, aunque no enfatizó la importancia de su hallazgo con respecto a la nucleación y pasó prácticamente desapercibido, el teorema de nucleación fue originalmente derivado por Hill en el contexto de su teoría termodinámica de sistemas pequeños [92].

Fundamentalmente, la aplicación de los teoremas de nucleación no está restringida a la TCN. Los teoremas son independientes del modelo que se utilice para los agregados, *e.g.*, con nucleación clásica o atomística, homogénea o heterogénea, tridimensional o bidimensional, etc., y pueden derivarse de consideraciones mecánicas estadísticas generales [78, 91].

En esencia, el teorema de nucleación establece que: Si el trabajo para la formación de un agregado de tamaño n se expresa como

$$W_{\text{teo}}(n) = n\Delta\mu + F(n, \Delta\mu) \quad \text{con} \quad (n \geq 1, \Delta\mu < 0), \quad (2.126)$$

en donde n es el número de átomos o moléculas que conforman el agregado, $\Delta\mu$ la diferencia de potencial químico entre las fases y $F(n, \Delta\mu)$ el exceso de energía libre del agregado, y si $W_{\text{teo}}^* = W_{\text{teo}}(n^*)$ y $F^* = F(n^*(\Delta\mu), \Delta\mu)$ son funciones diferenciables de $\Delta\mu$, entonces la relación

$$\frac{\partial W_{\text{teo}}^*}{\partial \Delta\mu} = n^* + \frac{\partial F^*}{\partial \Delta\mu}, \quad (2.127)$$

es siempre cierta.

Para derivar la expresión anterior, es necesario identificar que W_{teo} tiene un máximo en n^* , por lo que de la condición $(\partial W_{\text{teo}}/\partial n)_{n=n^*} = 0$, se traduce a que

$$\left(\frac{\partial W(n)}{\partial n}\right)_{n=n^*} = \Delta\mu + \left(\frac{\partial F(n, \Delta\mu)}{\partial n}\right)_{n=n^*} = 0, \quad (2.128)$$

que es la ecuación de Gibbs-Thompson en su forma general. Ahora, al derivar W_{teo} respecto a $\Delta\mu$ y evaluar en $n = n^*$, se obtiene

$$\left(\frac{\partial W(n)}{\partial \Delta\mu}\right)_{n=n^*} = n^* + \left[\Delta\mu + \left(\frac{\partial F}{\partial n}\right)_{n=n^*}\right] \frac{\partial n^*}{\partial \Delta\mu} + \left(\frac{\partial F}{\partial \Delta\mu}\right)_{n=n^*}. \quad (2.129)$$

El segundo término de la ecuación anterior es cero, debido al máximo de W_{teo} en n^* . Con esta simplificación, se llega precisamente a la Ec. (2.127). Este resultado es especialmente útil aplicado al tamaño crítico n^* , debido a su importancia en la cinética de la construcción de agregados.

En el caso del AECV, utilizando las Ecs. (2.68) y (2.73), el teorema de nucleación se enuncia como

$$\frac{\partial \Delta G^*}{\partial \Delta\mu} = n^*, \quad (2.130)$$

en donde la función $F(n, \Delta\mu) = \lambda\sqrt{n(n_{\text{agr}} - n)}$. En muchos casos de nucleación, la ecuación anterior permite realizar una determinación confiable de n^* utilizando datos experimentales para el ritmo de nucleación J en función de la diferencia de potencial químico, $\Delta\mu$ [52, 90]. Considere el logaritmo de J en la Ec. (2.118), y que Z es una función que depende débilmente de $\Delta\mu$ i.e.,

$$\ln J \approx \ln(c_s) + \ln \beta_n^* - \beta \Delta G_0^* (\sqrt{\Gamma^2 + 1} - \Gamma). \quad (2.131)$$

Por un lado, la derivada de $\ln J$ respecto a $\Delta\mu$ es

$$\frac{\partial \ln J}{\partial \Delta\mu} = \frac{\partial \ln \beta_n^*}{\partial \Delta\mu} - \frac{n_{\text{agr}} \beta}{2} \left(1 - \frac{\Gamma}{\sqrt{\Gamma^2 + 1}}\right) = \frac{\partial \ln \beta_n^*}{\partial \Delta\mu} - \beta n^*, \quad (2.132)$$

en donde se ha usado la regla de la cadena, junto con las Ecs. (2.69) y (2.72), y la definición $\Delta G_0^* \equiv n_{\text{agr}} \lambda / 2$. Por otro lado, a través de la diferencia de potencial químico $\Delta\mu$ en la Ec. (2.52), se escribe $\partial \Delta\mu / \partial \ln c_1 = -1/\beta$. De esta manera, se tiene que

$$\frac{\partial \ln J}{\partial \ln c_1} = \frac{\partial \ln J}{\partial \Delta\mu} \frac{\partial \Delta\mu}{\partial \ln c_1} = \frac{\partial \ln \beta_n^*}{\partial \Delta\mu} \frac{\partial \Delta\mu}{\partial \ln c_1} + n^*. \quad (2.133)$$

Finalmente, a partir de la Ec. (2.94), se puede escribir

$$\frac{\partial \ln \beta_n^*}{\partial \ln c_1} = 1. \quad (2.134)$$

Por lo tanto, se deduce que

$$\frac{\partial \ln J}{\partial \ln c_1} = 1 + n^*. \quad (2.135)$$

En un experimento *in vitro* de AECV vacías, la pendiente del ritmo de formación de la cápside con respecto a la concentración de subunidades libres está directamente relacionada con el tamaño del núcleo crítico. Las Ecs. (2.130) y (2.135), son útiles para comparar las teorías cinéticas y termodinámicas con simulaciones y experimentos. Adicionalmente, estos resultados pueden ayudar a comprender mejor el papel de los parámetros físicos en los aspectos biológicos de la construcción de cápsides virales.

2.7 Conclusiones

En este capítulo, se desarrolló una Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales (TAECV) dentro del contexto de una teoría de autoensamblaje en equilibrio, la Teoría Clásica de Nucleación (TCN) homogénea, y las ideas cuasiquímicas detrás de la formación de cápsides virales. La contribución de este capítulo en la tesis se concentra en la descripción del Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV) desde una perspectiva que combina estas descripciones teóricas y proporciona resultados equivalentes, a través de una estructura matemática formal, a los ya presentados en la literatura. Como resultado, se han derivado expresiones matemáticas capaces de reproducir los aspectos característicos de la dinámica y cinética de cápsides virales en condiciones intermedias de saturación, tal como se observa en experimentos y simulaciones computacionales.

La TAECV permite interpretar el proceso de formación de una cápside como una reacción química o una transición de fase de primer orden entre el estado libre y el estado agregado de las subunidades proteicas. Este proceso se describe utilizando la energía libre de formación de un agregado con n subunidades y un conjunto de ecuaciones maestras.

En este marco, se mostró que la TAECV explica los aspectos generales de la fenomenología observada en los experimentos *in vitro* de autoensamblaje: Un aspecto de especial relevancia es la existencia de una barrera de energía en el proceso de formación de una cápside. Esta barrera de energía se origina debido a la penalización a la energía libre por falta de interacciones subunidad-subunidad cuando una subunidad proteica se encuentra en el borde de un agregado incompleto de tamaño $n < n_{\text{agr}}$. Desde un punto de vista experimental, si la concentración total de proteínas se mantiene constante, la barrera energética aumentará con el tiempo debido al consumo gradual de las subunidades libres en la formación de agregados intermediarios. Esto, a su vez, resultará en una desaceleración en la tasa o ritmo de ensamblaje, J , hasta que eventualmente la formación de nuevas cápsides se vuelve indetectable en una escala de tiempo experimental razonable.

El análisis presentado en este capítulo ofrece argumentos sólidos que respaldan los fenómenos biológicos observados en distintas etapas del ciclo de replicación viral. En primer lugar, se destaca la importancia de la existencia de una barrera energética que cumple dos funciones cruciales: (i) por un lado, evita la formación significativa de agregados intermedios que podrían consumir todas las subunidades proteicas o presentar malformaciones que no cumplen con los requisitos del virus para empacar el material genético; (ii) por otro lado, impide la disolución de una cápside completamente formada. En segundo lugar, se pone de manifiesto el fenómeno de histéresis como un mecanismo vital para la salvaguarda del virus en condiciones muy distintas a las que ocurren durante el ensamblaje.

La Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales (TAECV) también puede utilizarse para predecir, al menos cualitativamente, la termodinámica y la cinética del ensamblaje de ciertos virus. Esto podría resultar especialmente útil para diseñar experimentos en condiciones que garanticen la producción eficiente de cápsides en escalas de tiempo razonables. Más aún, las simulaciones computacionales constituyen una alternativa útil para estudiar la cinética y termodinámica general involucradas en el Autoensamblaje de Virus (AEV). A través de modelos computacionales, es posible estudiar de forma sencilla los pasos intermedios del proceso, que podrían proporcionar información valiosa sobre los mecanismos de ensamblaje y las principales características del núcleo crítico.

En el siguiente capítulo, se estudia la influencia de la energía de flexión en el AECV por lo que, además de las contribuciones energéticas expuestas en el presente capítulo, se introduce la *energía de flexión*, un término adicional en la energía libre de Gibbs que está asociado a la deformación de la curvatura instantánea de una cápside en el proceso de ensamblaje hacia su estructura final.

Influencia de la Energía de Flexión en el Autoensamblaje de Cápsides Virales

3.1 Introducción

Una partícula viral puede estar sujeta a un estrés mecánico sustancial [52], por ejemplo, debido a un choque osmótico relacionado con un cambio repentino en la concentración de sal en el medio [89, 93, 94], o al empaquetamiento del material genético a altas densidades¹ [56]. Además, durante las diferentes etapas de la infección, la cápside viral puede sufrir cambios morfológicos al pasar de estados altamente estables, que protegen el genoma, a estados inestables que facilitan la liberación del material genético en la célula hospedera. Para asegurar la integridad del virus y que éste sea capaz de liberar el material genético en el momento oportuno, su cápside debe cumplir con tres características principales: (i) proteger al material genético contra amenazas ambientales, *e.g.*, el calor, desecación, y agresiones químicas; y (ii) facilitar su difusión hasta una célula u organismo susceptible de ser infectado y (iii) facilitar la entrada o liberación del material genético en la célula hospedadora. El cumplimiento de estos requisitos depende en gran medida de que las componentes del virus hayan sido fabricadas y ensambladas correctamente dentro de la célula hospedera. Además, para garantizar que la cápside y el virión en sí, sea un material capaz de responder y comportarse adecuadamente en función de las características del ambiente, después del autoensamblaje de la cápside, muchos virus atraviesan un proceso de maduración, en el cual ajustan adecuadamente sus propiedades físicas y mecánicas. Es evidente entonces que las cápsides, y sus propiedades mecánicas y elásticas, desempeñan un papel esencial en el ciclo de replicación viral. Por eso el estudio de su formación y propiedades es tan relevante, y comprender su metaestabilidad y plasticidad conformacional es clave para descifrar los mecanismos que gobiernan los pasos sucesivos en la infección viral. Además, la comprensión de los mecanismos que utilizan los virus para replicarse podrían impulsar el desarrollo de estrategias novedosas en áreas terapéuticas y de ingeniería nanotecnológica [25, 96].

El autoensamblaje *in vitro* de cápsides virales vacías, caracterizado por una geometría precisa y una distribución bien definida de subunidades proteicas, ha atraído la atención de la comunidad científica y ha sido objeto de múltiples investigaciones teóricas y experimentales [25, 26, 33, 36, 43, 76, 97-102]. En investigaciones recientes, se ha encontrado que el Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV) comparte similitudes sorprendentes con la cristalización bidimensional en un espacio curvo [43, 103], y por lo tanto puede ser modelado de manera análoga para considerar los efectos de la tensión elástica inducida por la curvatura Gaussiana [43, 103]. Estos efectos son potencialmente

¹Ciertos bacteriófagos experimentan presiones de decenas de atmósferas en las paredes de sus cápsides debido al genoma viral confinado dentro de ellas [25]. Durante la maduración, las cápsides de algunos bacteriófagos sufren una transformación de una procápside esférica a una procápside poliédrica [6, 95].

importantes para cualquier proceso que implique el ordenamiento de subunidades idénticas en espacios curvos, tal como el autoensamblaje de monocapas moleculares y el crecimiento de dominios sólidos en vesículas [103].

Siguiendo la línea de discusión presentada en el Capítulo 2, este capítulo se centra en el estudio teórico de cómo la energía de flexión influye en la formación de cápsides esféricas vacías *in vitro*. Estos avances no solo amplían el marco teórico de la Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales (TAECV), sino que también ofrecen valiosas perspectivas sobre los procesos de autoensamblaje en estructuras complejas.

El autoensamblaje exitoso de una cápside viral es un paso clave en el ciclo de replicación de un virus [1, 2, 4]. En el Capítulo 2, se vio cómo la formación de la cápside de radio fijo y predeterminado se puede modelizar usando la Teoría Clásica de Nucleación (TCN). De acuerdo con este modelo, la competencia entre la energía de unión, $n\Delta\mu$, y el coste energético asociado a la tensión lineal en el borde de la cápside, $\lambda\sqrt{n(n_{\text{agr}} - n)}$ (primer y segundo término del extremo derecho de la Ec. (2.68), respectivamente), genera una barrera de energía, ΔG^* , que debe superarse para completar el autoensamblaje [31, 42, 52]. En las condiciones ambientales correctas, *i.e.*, concentraciones adecuadas de subunidades libres y salinidad, pH, fuerza iónica y temperatura, las fluctuaciones térmicas inducen la formación de agregados o cápsides parcialmente formadas que tienden a disolverse a menos que alcancen un tamaño crítico con n^* subunidades (véase la Ec. (2.72)). Los agregados que se componen de $n \geq n^*$ crecen progresivamente hasta que alcanzan el número de agregación n_{agr} , correspondiente al virus completo en cuestión, *e.g.*, $n_{\text{agr}} = 72$, que corresponde a los 72 pentámeros que conforman una cápside $T_r = 7$ nativa del Virus del Papiloma Humano (VPH) [50]. Una vez que la cápside se ha completado con n_{agr} subunidades no se disuelve en las mismas condiciones ambientales, lo que justifica el fenómeno de histéresis (consultar Secciones 2.4 y 2.5)

Si bien la teoría estadística de AECV presentada en el Capítulo 2 logra replicar, al menos cualitativamente, los fenómenos observados experimentalmente, se advierte que al formular el modelo, *e.g.*, las Ecs. (2.25) y (2.68), así como los resultados que se desprenden de él, se ignoró por completo cualquier tipo de penalización en la energía libre generada por la curvatura de la estructura en formación. El crecimiento de una estructura sobre una superficie curva conlleva necesariamente la acumulación de energía elástica [43]. Esta contribución elástica puede llegar a generar un mecanismo de autoensamblaje autolimitante que implica la formación de cápsides parciales de tamaño finito que no crecen hasta cerrarse [36, 98]. Esto ocurre cuando, a medida que el crecimiento de la cápside parcial continua, la penalización de la energía elástica llega a ser más grande que la energía de unión que impulsa el autoensamblaje. En consecuencia, podría observarse la aparición de grandes cantidades de cápsides parcialmente formadas aparentemente estables [96], lo cual, a su vez, contradeciría la afirmación de que hay cantidades despreciables de estos intermediarios en el estado final de una solución de autoensamblaje (ver Sección 2.3) y sugiere una posible vía de frustración de ensamblaje óptimo.

En este capítulo, se introduce la penalización por efectos de curvatura en la teoría estadística de autoensamblaje mediante la adición de la energía elástica, G_{ela} , en la energía libre del sistema. La contribución principal se centra en analizar el límite en el que la energía de flexión domina sobre la acumulación de esfuerzo de compresión. Dentro de este contexto, se examinan las modificaciones resultantes en el tamaño del virus resultante y en los parámetros clave de la teoría, específicamente en la altura de la barrera de energía, ΔG^* , el número crítico de agregación, n^* , y en el ritmo de nucleación o autoensamblaje, J . El capítulo se divide como sigue:

En la Sección 3.2, se presenta una breve introducción a los fundamentos de las contribuciones elásti-

cas en el AECV. Posteriormente, se introduce la energía de flexión, G_{flex} , junto con las expresiones matemáticas para su modelado. Se analiza la energía libre total de formación de una cápside vacía con energía de flexión en dos representaciones distintas: una que utiliza como grados de libertad el número instantáneo de subunidades, n , y el ángulo de completitud, θ , y otra que emplea n y el radio instantáneo de la cápside, R .

En la Sección 3.3, se estudia la energía libre en la representación (n, R) , se analiza el paisaje de energía, los extremos y las «trayectorias» de autoensamblaje. Además, se caracteriza el efecto de la energía de flexión en estas cantidades y se comparan los resultados con los del «modelo clásico» presentados en el Capítulo 2. La sección concluye con una discusión del *régimen de estabilidad de una cápside de tamaño subóptimo*, en donde se establecen valores mínimos (máximos) para la supersaturación, Γ ($\Delta\mu$) que garantizan la estabilidad de una cápside completa.

Posteriormente, en la Sección (3.4), se discuten los efectos sobre la barrera de energía y se introduce el concepto de «desaparición del punto crítico», para luego estudiar los casos límite de la altura de la barrera de energía, ΔG^* .

A continuación, en la Sección 3.5, se emplea la metodología de la TCN de sistemas multicomponentes para derivar la ecuación que describe la cinética de AECV con dos grados de libertad: n y R . A partir de aquí, se presentan y analizan las expresiones del ritmo de nucleación en el estado estacionario y se contrastan con el modelo clásico.

En la Sección 3.6, se adaptan los resultados de la Sección 3.5 para calcular el ritmo de nucleación de desensamblaje y evaluar los efectos de G_{flex} en la disociación de cápsides virales, comparando con el modelo clásico de la Sección 2.5.

Finalmente, en la Sección 3.7, se utilizan las propiedades geométricas y mecánicas de algunos virus esféricos reales (estimadas como se indica en la Sección 3.9.1), para estimar la influencia de estos mecanismos en el autoensamblaje y ritmo de nucleación de cápsides virales, especialmente en el caso del Virus de Simio 40 (VS40).

3.2 Autoensamblaje de una Cápside Viral Incorporando las Contribuciones Elásticas

3.2.1 Energía libre de Autoensamblaje

La descripción continua del autoensamblaje se basa en la TCN [31, 42, 52] (ver Sección 2.3). Esta teoría permite calcular la altura de la barrera de energía, ΔG^* , y el número crítico de agregación, n^* , considerando exclusivamente la competición entre la energía de unión y la energía de borde. Sin embargo, debido a la curvatura que adquiere la cápside, y a la existencia de un ángulo preferido de interacción entre las piezas de ensamblaje, la energía elástica debe ser también considerada en la formulación de la energía libre, ΔG , para capturar los mecanismos de AECV de manera más adecuada. De acuerdo con esto, la energía libre de formación de una cápside parcialmente formada se puede escribir como sigue [36, 43]:

$$\Delta G = n\Delta\mu + \tau_\lambda l(n, \theta, R) + G_{\text{ela}}, \quad (3.1)$$

siendo n el número instantáneo de subunidades en la cápside, $n\Delta\mu$ la diferencia de energía intrínseca, entre tener las n subunidades proteicas en la cápside o libres en la solución,² τ_λ la tensión lineal

²Es importante señalar que al formular la Ec. (3.1) de esa manera, se requieren valores negativos del potencial químico $\Delta\mu$ para promover el autoensamblaje. La estructura de esta ecuación se puede derivar al añadir grados de libertad de la forma

$$b_n = G_{\text{plano}} + G_{\text{flex}}, \quad (3.2)$$

en la función de partición de la Ec. (2.16) y seguir un proceso similar al que se presenta en las Secciones 2.2 y 2.3.

y $l(n, \theta, R)$ la longitud del borde en términos de n , el ángulo de completitud, θ , y el radio instantáneo de curvatura, R . El segundo término de la ecuación anterior corresponde a la energía del borde para una cápside parcial con n subunidades. Finalmente, $G_{\text{ela}} = G_{\text{plano}} + G_{\text{flex}}$, es la energía elástica, asociada tanto con la compresión en el plano, G_{plano} , como con la energía de flexión, G_{flex} , introducida por la curvatura de la cápside. Los términos de estiramiento y flexión dentro de G_{ela} dependen de la geometría particular del agregado en crecimiento.

Recientemente, utilizando teoría de elasticidad y simulaciones de *grano grueso*, C. Mendoza y D. Reguera estudiaron la selección de forma y el ensamblaje incorrecto de cápsides virales en términos de tres parámetros escalados [43], *i.e.*, la tensión lineal, τ_λ , el potencial químico $\Delta\mu$ y el número de Föppl-von Kármán (FvK), γ_{FvK} , que es la relación entre las contribuciones de estiramiento y la energía de flexión (consultar Sección 3.9). En sus cálculos utilizaron (i) una generalización del modelo de Helfrich [104] para la energía de flexión, y (ii) resultados de la teoría de elasticidad continua para deformaciones pequeñas en placas delgadas, utilizada para describir la formación y crecimiento de dominios cristalinos en superficies curvas [103, 105, 106], con el objetivo de modelar la energía elástica en el plano. El objetivo principal de ese estudio era determinar cuál de las distintas geometrías que podía adoptar el virus era la más estable. En contraste, este capítulo se centra en abordar únicamente las penalizaciones energéticas asociadas con la energía de flexión, G_{flex} , y en los efectos que tiene en la cinética de formación de virus esféricos. Este enfoque facilita un análisis inicial de las modificaciones que esta implementación introduce en el modelo presentado en la Sección 2.3, centrándose especialmente en el cálculo de la barrera de energía, el número crítico de agregación y el ritmo de nucleación o autoensamblaje, siendo este último un aspecto poco explorado hasta ahora.

3.2.2 Modelado de la Energía de flexión

Como se discutió anteriormente, una de las contribuciones de la energía elástica, G_{ela} , es la energía de flexión, G_{flex} , asociada con desviaciones de la curvatura instantánea R respecto a la *curvatura preferencial*, que se denomina R_T . El análisis de esta sección se restringe al estudio de la formación de cápsides que crecen como casquetes esféricos con curvatura uniforme $1/R$, en el límite $\gamma_{\text{FvK}} \ll 1$, en el que dominan la energía de flexión sobre la energía de deformación en el plano. Por lo tanto, en este límite, podemos menospreciar la contribución de la energía de compresión en el plano G_{plano} , frente a la energía de flexión, de modo que consideraremos únicamente G_{flex} .

El proceso de ensamblaje de la cápside en este caso ocurre como se muestra esquemáticamente en la Fig. 3.1. Inicialmente, las subunidades proteicas se difunden libremente en una solución acuosa. Estos bloques de construcción, que se muestran esquemáticamente en el extremo izquierdo de la Fig. 3.1 como esferas de tonalidad naranja, tienen un *área nominal*³ a_1 , y una interacción anisotrópica definida por un ángulo preferido de interacción entre las subunidades que determina un *radio de curvatura preferencial*, R_T , y un *número de agregación preferencial*, n_T . Debido a las interacciones subunidad-subunidad, las subunidades libres forman agregados que posteriormente se convierten en el embrión o núcleo de la cápside. Al igual que en el modelo clásico de AECV del Capítulo 2, se considera que la agregación de las subunidades libres induce la formación de un casquete esférico con un borde de longitud $l(n, \theta, R)$, el cual depende del número instantáneo de subunidades, n , y del ángulo de completitud, θ , o el radio de curvatura, R , y da lugar a la penalización de energía asociada al borde, la cuál continúa hasta que la cápside se cierra. A diferencia del Capítulo 2, ahora se considera que esta cápside esférica parcial no tiene un radio fijo, sino que puede adoptar

³En el contexto de AECV, el término «área nominal» se refiere al área efectiva que ocupa una subunidad estructural sobre la superficie de una cápside esférica, definida por interacciones estéricas, *i.e.*, interacciones no covalentes.

cualquier valor del radio R . Durante el autoensamblaje, la penalización de la energía elástica surge de las deformaciones de flexión siempre que R sea diferente de R_T . La curvatura preferencial se muestra como una esfera azul tenue en los diferentes pasos del autoensamblaje representados en la Fig. 3.1. La forma más simple de modelar las deformaciones de flexión se obtiene al considerar dicha contribución como una energía de flexión similar a la de una membrana [36]. Es decir, la energía de flexión se representa por

$$G_{\text{flex}} = \frac{\kappa}{2} \int_{\Omega} \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{R_T} \right)^2 dA, \quad (3.3)$$

siendo κ el módulo de flexión, R el *radio instantáneo de curvatura* y Ω el dominio en donde se realiza la integración, *i.e.*, la superficie que constituye el área nominal de la cápside parcialmente formada. En este modelo, la integral de la Ec. (3.3) puede realizarse directamente debido a que se

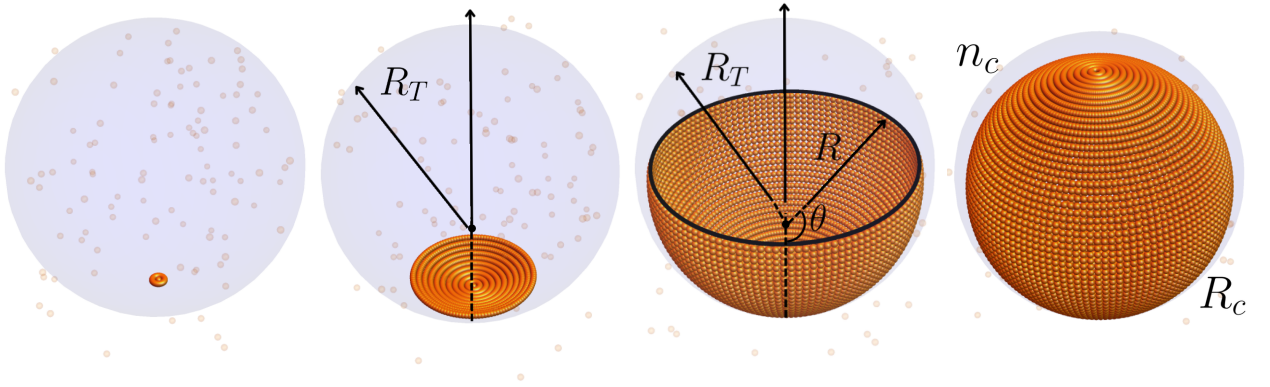


Figura 3.1: Representación esquemática del autoensamblaje de una cápside viral con energía de flexión. El proceso de autoensamblaje se despliega de izquierda a derecha. Inicialmente, las subunidades libres comienzan a asociarse formando agregados que, al alcanzar un tamaño crítico n^* , actúan como un embrión o núcleo de la cápside, el cual crece hasta formar una cubierta proteica cerrada. Durante este proceso, la competencia entre la energía de unión, $n\Delta\mu$, la energía de borde, $\tau_\lambda l(n, \theta, R)$, y la energía de flexión, G_{flex} , hace que la cápside se cierre prematuramente con $n < n_T$ y, por lo tanto, para $R < R_T$. Al culminar, la cápside completa consta de n_c subunidades y tiene un radio R_c .

asume que la cápside parcial tiene un curvatura uniforme R . De esta manera, se tiene que

$$G_{\text{flex}} = \frac{\kappa}{2} \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{R_T} \right)^2 \int_{\Omega} dA, \quad (3.4)$$

y la operación se reduce a multiplicar por el área de un casquete esférico parcialmente formado, *i.e.*, $2\pi R^2(1 - \cos \theta)$, donde θ es, nuevamente, el ángulo de completitud.

Por un lado, usando la Ec. (2.54), es posible relacionar el área ocupada por una subunidad individual sobre una cápside completamente formada que tenga el radio de curvatura preferencial $R = R_T$, y que por lo tanto posea $n_{\text{agr}} \rightarrow n_T$ subunidades, *i.e.*,

$$a_1 = \frac{4\pi R_T^2}{n_T}. \quad (3.5)$$

Por otro lado, a partir de la Ec. (2.59), se concluye que el número instantáneo de subunidades en un agregado con ángulo de completitud θ está dado por

$$n = \frac{2\pi R^2(1 - \cos \theta)}{a_1}. \quad (3.6)$$

De esta manera, la energía de flexión toma la siguiente forma:

$$G_{\text{flex}} = \frac{\kappa}{2} \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{R_T} \right)^2 [2\pi R^2(1 - \cos \theta)] = \frac{2\pi\kappa n}{n_T} \left[\sqrt{\frac{(1 - \cos \theta)n_T}{2n}} - 1 \right]^2. \quad (3.7)$$

Adicionalmente, la energía de tensión lineal σ_n (ver Ecs. (2.16) y (2.51)) se puede expresar como

$$\sigma_n = \tau_\lambda l(n, \theta) = 2\pi R \sin \theta \tau_\lambda = \sqrt{\frac{2\pi a_1 n}{1 - \cos \theta}} \sin \theta \tau_\lambda. \quad (3.8)$$

Usando conjuntamente las Ecs. (3.7) y (3.8), se obtiene de manera explícita la energía libre de formación de una cápside parcialmente formada que contiene n subunidades y un ángulo de completitud θ ,

$$\Delta G(n, \theta) = n\Delta\mu + \frac{2\pi\kappa n}{n_T} \left[\sqrt{\frac{(1 - \cos \theta)n_T}{2n}} - 1 \right]^2 + \sqrt{\frac{2\pi a_1 n}{1 - \cos \theta}} \sin \theta \tau_\lambda. \quad (3.9)$$

La energía libre de Gibbs del sistema contiene (i) la energía de agregación entre subunidades libres (o energía de unión), $n\Delta\mu$, (ii) el coste energético asociado a la flexión, *i.e.*, desviaciones de la curvatura instantánea respecto a la curvatura preferencial y (iii) la penalización del borde. Las dos últimas contribuciones energéticas corresponden al segundo y tercer término de la ecuación anterior, respectivamente. El efecto de competición entre la energía de flexión y la energía de borde, promueve el autoensamblaje de cápsides con un número de subunidades menor a n_T y, por lo tanto, con un radio menor al preferencial, R_T , como se verá con detalle en las siguientes secciones.

3.2.3 Autoensamblaje en representación (n, θ)

En 2021, M. Hagan y G. Grason utilizaron el término *ensamblaje autolimitante* para describir procesos de ensamblaje que resultan en estructuras complejas de tamaño finito [36]. Su revisión se centró en dos categorías de ensamblaje autolimitante: (i) *ensambles de cierre automático* y (ii) *ensambles de frontera abierta*. Particularmente, en su sección introductoria a la termodinámica autolimitada de cáscaras y cápsulas, consideraron un modelo simple para la penalización energética de las deformaciones por flexión a través de un término adicional en la energía libre como el que se muestra en la Ec. (3.3). Con la intención de delinear un camino claro hacia la determinación de los parámetros físicos que gobiernan el AECV, a continuación se presenta un examen exhaustivo del AECV con energía de flexión, que sigue, al menos en sus aspectos fundamentales, el tratamiento propuesto por M. Hagan y G. Grason [36]. Posteriormente, a partir de la Sección 3.2.4 y hasta el final del capítulo, se llevan estas ideas a un nivel más profundo, ampliando la TAECV en diversas direcciones que han sido poco exploradas.

A diferencia de la energía libre de Gibbs del modelo clásico dada por la Ec. (2.68), la Ec. (3.9) se caracteriza, entre otras cosas, por depender de dos variables distintas e independientes. Según la representación elegida, estas variables pueden ser el número instantáneo de subunidades presentes

en un agregado de tamaño n , y el radio instantáneo de curvatura R , o alternatively, el ángulo de completitud θ . Este enfoque refleja el hecho de que si bien la inclusión de múltiples parámetros en la descripción de la energía libre de Gibbs permite una modelización más «*realista*» del AECV, también introduce un mayor grado de complejidad en el procedimiento matemático y físico-estadístico del cálculo de las cantidades importantes del sistema, *e.g.*, la altura de la barrera de energía.

Inicialmente, considere la representación (n, θ) de la energía libre del sistema, es decir, la Ec. (3.9), que es la representación analizada en [36]. Al dividir la energía libre de Gibbs, $\Delta G(n, \theta)$, por κ , y reacomodando el resultado, se obtiene la *energía libre escalada* del sistema, $\Delta \mathcal{E}(n_r, \theta)$, a saber,

$$\Delta \mathcal{E}(n_r, \theta) \equiv \frac{\Delta G(n, \theta)}{\kappa} = n_r \Upsilon + 2\pi n_r \left(\sqrt{\frac{1 - \cos \theta}{2n_r}} - 1 \right)^2 + 4\pi \sqrt{\frac{n_r}{1 - \cos \theta}} \sin \theta \tilde{f}, \quad (3.10)$$

en donde se ha definido $\Upsilon \equiv \Delta \mu n_T / \kappa$, $n_r \equiv n / n_T$ y $R_r \equiv R / R_T$, junto con la *tensión lineal escalada de la cápside* $\tilde{t}$, la cual está definida por

$$\tilde{t} \equiv \left(\frac{a_1 n_T}{8\pi} \right)^{1/2} \frac{\tau_\lambda}{\kappa} = \frac{R_T}{\sqrt{2}} \frac{\tau_\lambda}{\kappa}. \quad (3.11)$$

La Fig. 3.2 representa gráficamente el paisaje de energía libre escalada en función de n_r y θ . La línea blanca discontinua representa la *trayectoria* de una cápside que se forma siguiendo la curvatura preferencial, $R = R_T$. Se puede ver fácilmente que si se fija $R = R_T$, la energía de flexión, dada por la Ec. (3.7), se anula, y el modelo se reduce al que fue desarrollado en el Capítulo 2.

En el caso general, la cápside en formación puede explorar el paisaje de energía, variando tanto el número de subunidades, n , como el radio, R , o el grado de completitud, θ . La hipótesis más razonable es que, durante el proceso de autoensamblaje, la cápside seguirá naturalmente la Trayectoria de Mínima Energía (TME) que es la que minimiza localmente la energía libre escalada $\Delta \mathcal{E}(n_r, \theta)$.

La TME se obtiene encontrando la relación entre n_r y θ que minimiza la Ec. (3.10). Con este propósito, se deriva la energía escalada respecto a θ mientras se mantiene n_r constante. Esto resulta, después de algunos pasos de álgebra, en

$$\left(\frac{\partial \Delta \mathcal{E}(n_r, \theta)}{\partial \theta} \right)_{n_r, R} = - \frac{4\pi \sin^3(\theta/2)}{(1 - \cos \theta)^{3/2}} \left[\cos(\theta/2) (\sqrt{2n_r} - \sqrt{1 - \cos \theta}) + 2\tilde{t} \sqrt{n_r} \sin(\theta/2) \right]. \quad (3.12)$$

Igualando la ecuación anterior a cero y resolviendo para n_r^{TME} , se obtiene una relación implícita entre el ángulo de completitud θ^{TME} y el *número instantáneo de subunidades escalado* que define la TME, *i.e.*,

$$n_r^{\text{TME}} \equiv \frac{n^{\text{TME}}}{n_T} = \frac{\cos^2(\theta^{\text{TME}}/2) (1 - \cos \theta^{\text{TME}})}{2 \left[\cos(\theta^{\text{TME}}/2) + \sqrt{2}\tilde{t} \sin(\theta^{\text{TME}}/2) \right]^2}. \quad (3.13)$$

El comportamiento característico de n_r^{TME} , junto con el paisaje de la energía libre escalada en el espacio fase (n_r, θ) , se representa gráficamente en la Fig. 3.2.

La línea verde en la Fig. 3.2 muestra la TME sobre la superficie $\Delta \mathcal{E}(n_r, \theta)$, indicando gráficamente cómo se autoensambla una cápside bajo el efecto de competición entre la energía de borde y la energía de flexión. A medida que un agregado de tamaño n_r crece con la adición discreta de subunidades libres, el tamaño del borde expuesto aumenta y, con él, el coste energético de la energía de borde. Para disminuir este coste, la cápside tiende a disminuir el radio por debajo del radio óptimo, pero esto genera un coste en energía de flexión.

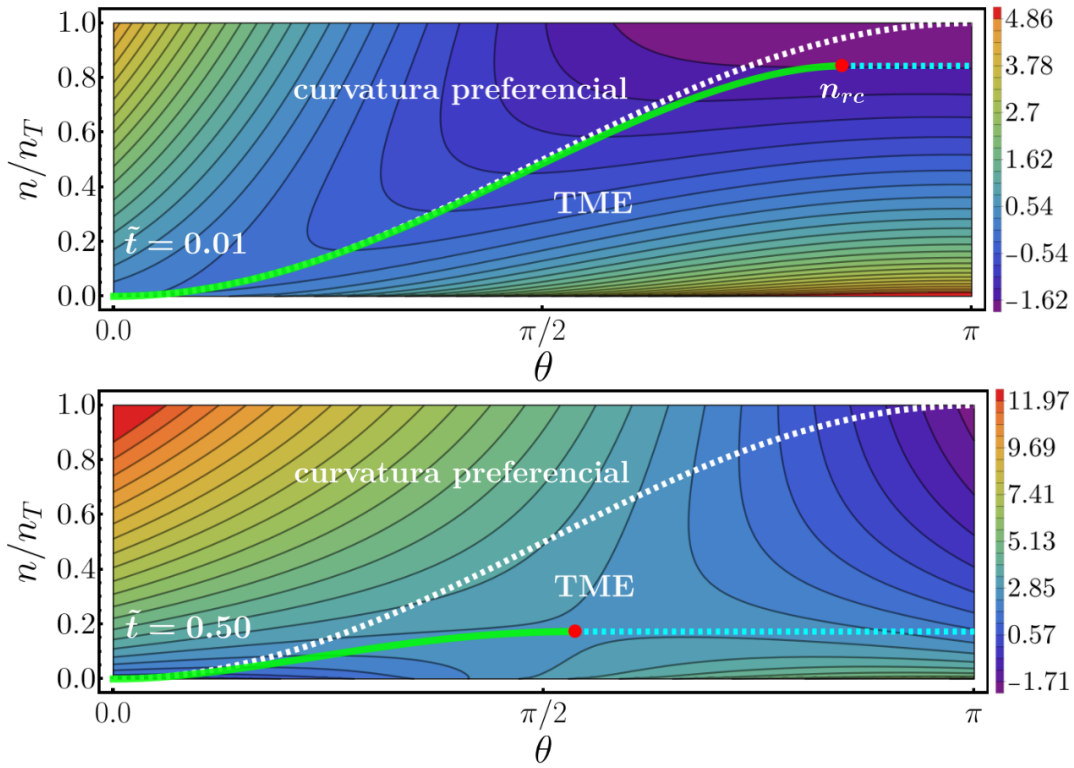


Figura 3.2: Paisaje de energía libre escalada del modelo de AECV con energía de flexión, Ec. (3.10), en función del número instantáneo de subunidades escalado, n/n_T , y el ángulo de completitud, θ , para un valor de la *pseudo supersaturación* de $\Upsilon = -2.0$ y dos valores diferentes de la tensión lineal escalada de la cápside, *i.e.*, $\tilde{t} = 0.01$ y 0.50 . En esta representación, los valores bajos de energía escalada aparecen en color morado, mientras que los valores altos se muestran en color rojo. La línea blanca discontinua representa la «trayectoria» de una cápside que se forma siguiendo la curvatura preferencial, $R = R_T$. A su vez, la línea verde muestra la TME, indicando cómo se autoensamblaría una cápside bajo el efecto de competición entre la energía de borde y la energía de flexión. Finalmente, la línea cyan discontinua muestra el comportamiento de la cápside después de alcanzar n_c subunidades.

La competición entre la energía de borde, $l(n, \theta)\tau_\lambda$, y la energía de flexión, G_{flex} , favorece la compresión de cápsides parcialmente formadas a radios menores al radio de curvatura preferencial, *i.e.*, $R < R_T$. La compresión aumenta hasta un número máximo escalado de subunidades, n_{rc} , tal que desaparece el mínimo local de energía en θ . Este punto, representado con un punto en color rojo en la Fig. 3.2, corresponde al valor máximo de n_r^{TME} e indica el *número de cierre escalado* definido como $n_{rc} \equiv n_c/n_T$, en donde n_c es el *número de cierre*. A partir de este punto, la cápside inicia su proceso de cierre, sin agregar nuevas subunidades, mediante una reducción del radio, tal como muestra la línea discontinua color cyan.

Para el ejemplo representado en la parte superior de la figura, que corresponde a valores de $\Upsilon = -2.0$ y $\tilde{t} = 0.01$, se observa que $n_{rc} = 0.8$, es decir que la cápside se cerraría de forma espontánea con un 80 % de las subunidades que tendría la cápside con curvatura preferencial. Por lo tanto, en presencia de la energía de flexión, las cápsides tienden a cerrarse prematuramente a tamaños subóptimos. Este efecto se acentúa cuanto mayor es el valor de la tensión lineal escalada de la cápside, como se ve en el panel inferior de la Fig. 3.2.

La representación del autoensamblaje en el espacio (n_r, θ) , introducida por M. Hagan y G. Grason en [36], permite describir el efecto de compresión de cápsides y su interpretación a través del paisaje de energía. Sin embargo, el uso del ángulo de completitud, θ , como uno de los grados de libertad de autoensamblaje complica la deducción de otras propiedades de este fenómeno, por ejemplo, en lo que concierne a describir la cinética. Alternativamente, como se verá más adelante, la elección de n y R como grados de libertad de autoensamblaje puede generar ecuaciones más simples y directas para caracterizar la estructura y geometría de la cápside, facilitando el análisis matemático y, por ende, el empleo de herramientas y técnicas de las teorías físicas existentes. Además, las coordenadas (n, R) se relacionan de manera más directa con propiedades físicas observables.

A continuación, se describe el AECV con energía de flexión en el espacio (n, R) y, a partir de la construcción de $\Delta G(n, R)$ y su versión adimensional, $\Delta \mathcal{E}(n_r, R_r)$, se calcula la altura de la barrera de energía escalada, $\Delta \mathcal{E}^*$, el número crítico de subunidades escalado y el radio crítico de curvatura escalado, *i.e.*, n_r^* y R_r^* , correspondientes al núcleo crítico.

3.2.4 Autoensamblaje en la representación (n, R)

El autoensamblaje en la representación (n, R) requiere la reescritura de la energía libre de Gibbs. Para obtener los dos primeros términos de la Ec. (3.9) en términos de n y R se pueden emplear directamente las Ecs. (3.5)-(3.7), lo que conduce a

$$\Delta G(n, R) = n\Delta\mu + 2\pi\kappa \frac{n}{n_T} \left(\frac{R_T}{R} - 1 \right)^2 + \tau_\lambda l(n, R), \quad (3.14)$$

donde se ha reemplazado la energía del borde por su definición original (véase la Ec. (2.51)).

Ahora, se aborda la determinación la longitud del borde en términos de n y R . Al sustituir a_1 de la Ec. (3.5) en la Ec. (3.6) y elevar el resultado al cuadrado se obtiene que

$$n^2 = \left[\left(\frac{R}{R_T} \right)^2 \left(\frac{n_T}{2} \right) (1 - \cos \theta) \right]^2 = \left(\frac{R}{R_T} \right)^4 \left(\frac{n_T}{2} \right)^2 [2(1 - \cos \theta) - \sin^2 \theta]. \quad (3.15)$$

Utilizando las Ecs. (2.60) y (3.6) se concluye entonces

$$n^2 = \frac{R^2}{R_T^4} \left(\frac{n_T}{2} \right)^2 \left(\frac{4nR_T^2}{n_T} - \frac{l^2}{4\pi^2} \right). \quad (3.16)$$

Ahora, resolviendo para l y después de un poco de álgebra, se encuentra la siguiente expresión:

$$l(n, R) = \frac{4\pi R_T}{R n_T} \sqrt{n(n_T R^2 - n R_T^2)}. \quad (3.17)$$

Por último, sustituyendo la Ec. (3.17), en la Ec. (3.14), se obtiene la energía libre de formación de una cápside que contiene n subunidades y tiene un radio de curvatura R ,

$$\Delta G(n, R) = n\Delta\mu + 2\pi\kappa \frac{n}{n_T} \left(\frac{R_T}{R} - 1 \right)^2 + \lambda_T \frac{R_T}{R} \sqrt{n \left(n_T \frac{R^2}{R_T^2} - n \right)}, \quad (3.18)$$

siendo

$$\lambda_T \equiv \frac{4\pi R_T \tau_\lambda}{n_T}, \quad (3.19)$$

una *constante de energía de borde* relacionada con la tensión lineal, similar a la definida en la Ec. (2.63). Las contribuciones energéticas en $\Delta G(n, R)$, Ec. (3.18), son idénticas a las listadas debajo de la Ec. (3.9). Sin embargo, el análisis del efecto de competición entre las energías de unión, borde y flexión, así como sus consecuencias físicas, son más accesibles de modelar y explicar con esta expresión.

Al dividir la energía libre de Gibbs por el producto $\lambda_T n_T$, utilizando las variables adimensionales $n_r \equiv n/n_T$ y $R_r \equiv R/R_T$, y las definiciones de la *supersaturación* Γ y la *constante de flexión* $\tilde{f}_r$, *i.e.*,

$$\Gamma \equiv -\frac{\Delta\mu}{\lambda_T} \quad \text{y} \quad \tilde{f}_r \equiv \frac{2\pi\kappa}{\lambda_T n_T}, \quad (3.20)$$

se obtiene una expresión muy sencilla para la energía libre escalada del sistema,

$$\Delta\mathcal{E}(n_r, R_r) \equiv \frac{\Delta G(n, R)}{\lambda_T n_T} = n_r \left[\tilde{f}_r \left(\frac{1}{R_r} - 1 \right)^2 - \Gamma \right] + \sqrt{n_r \left(1 - \frac{n_r}{R_r^2} \right)}. \quad (3.21)$$

La energía de formación escalada de la cápside depende esencialmente de supersaturación y la constante de flexión. Este parámetro adimensional $\tilde{f}_r$ mide la importancia relativa de la energía de flexión comparada con la tensión lineal.

En la siguiente sección, se presentan los distintos paisajes de energía libre de Gibbs escalada que genera la Ec. (3.21) para diferentes valores de Γ y $\tilde{f}_r$. Posteriormente, se lleva a cabo el análisis de la formación de cápsides virales con energía de flexión utilizando las herramientas de la TCN. Los resultados de este análisis permiten predecir el tamaño y la estabilidad de una cápside en función de las condiciones ambientales en las que se ensambla.

3.3 Paisaje de Energía Libre de Autoensamblaje en la representación (n, R)

Un paisaje de energía muestra gráficamente cómo la energía de un sistema cambia en función de sus grados de libertad. Los mínimos, que suelen representar estados estables, se visualizan como valles, mientras que los máximos locales, que pueden ser estados inestables o puntos silla, se representan como picos [73, 74]. Por un lado, a mayor profundidad de un mínimo, mayor estabilidad tendrá esa configuración del sistema. Por otro lado, los máximos locales se interpretan como barreras energéticas que deben superarse para alcanzar otro estado local o globalmente estable.⁴ En particular, en el estudio del AECV que considera la energía de flexión, el paisaje de energía depende de dos grados de libertad, n y R . Sobre esta superficie de energía se define la trayectoria «*preferida*» del sistema para transitar entre diferentes estados, por ejemplo, entre el estado libre y agregado. Esta trayectoria que minimiza localmente la energía se ha denominado anteriormente como la Trayectoria de Mínima Energía (TME).

Siguiendo el enfoque de la Sección 3.2.3 (ver la Ec. (3.13)), el autoensamblaje de la cápside se puede describir como una excursión en el paisaje de energía libre, ahora bidimensional, descrito por la Ec. (3.21). En este contexto, es posible obtener una expresión que describa la TME en el espacio (n, R) , a través de una relación entre n_r y R_r que refleje la condición de minimización local de la energía.

⁴La barrera de energía ya ha sido discutida en el Capítulo 2, donde se establece que la energía libre del sistema depende únicamente del número de subunidades. El tamaño del núcleo crítico, n^* , de la Figura 2.5, representa la posición de la barrera energética en el eje n . En la Fig. 2.5, se muestra un paisaje de energía unidimensional en condiciones de equilibrio (línea azul) y de supersaturación (línea naranja).

Derivando la energía libre escalada, Ec. (3.21), respecto a R_r , manteniendo n_r constante, se obtiene

$$\left(\frac{\partial \Delta \mathcal{E}(n_r, R_r)}{\partial R_r} \right)_{n_r} = \frac{n_r}{R_r^3} \left[2\tilde{f}_r(R_r - 1) - \frac{n_r R_r \sqrt{\frac{R_r^2}{n_r} - 1}}{n_r - R_r^2} \right]. \quad (3.22)$$

Al igualar a cero el resultado anterior y resolver para n_r^{TME} , se obtiene, de forma implícita, la ecuación que describe la TME y que está dada por:

$$n_r^{\text{TME}} = \frac{4\tilde{f}_r^2(R_r - 1)^2 R_r^2}{4\tilde{f}_r^2(R_r - 1)^2 + R_r^2}. \quad (3.23)$$

La Figura 3.3 muestra la superficie de energía libre escalada, $\Delta \mathcal{E}(n_r, R_r)$, (véase la Ec. (3.21)) que se genera con $\Gamma = 0.4$ y $\tilde{f}_r = 5.0$. La TME se representa con una línea verde e indica cuál es el camino preferencial que seguiría una cápside parcial para llegar al final de autoensamblaje. A continuación se explica detalladamente el comportamiento del paisaje de energía y las diferentes etapas en el AECV.

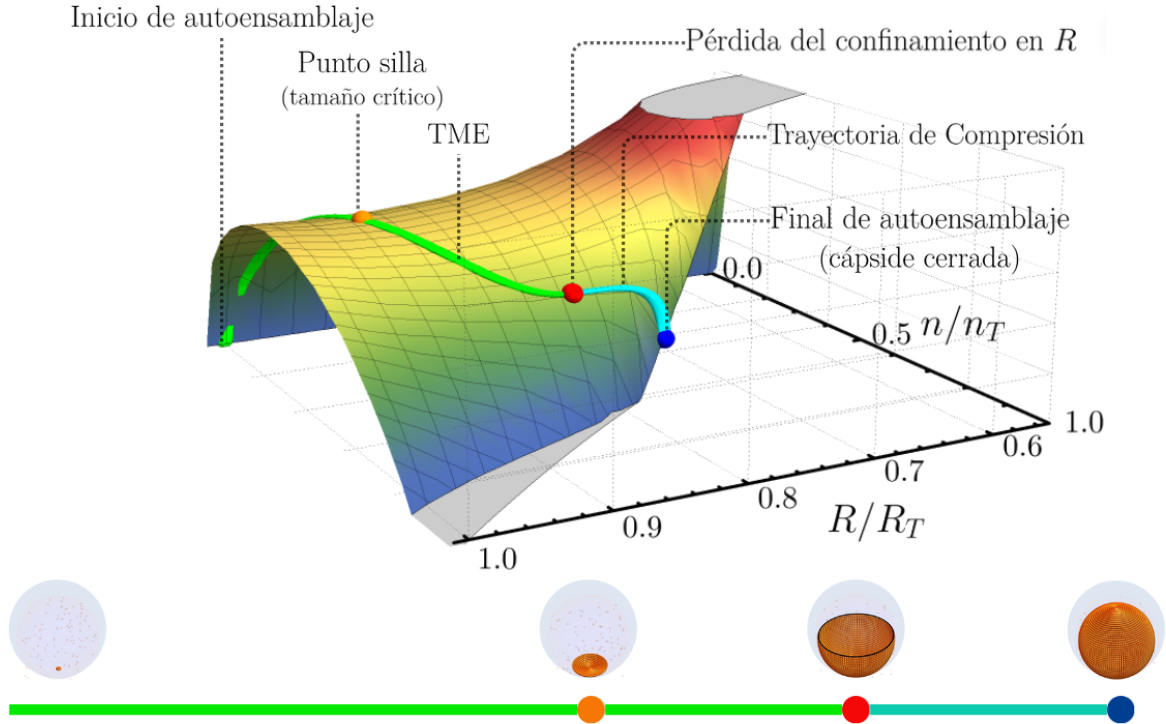


Figura 3.3: Representación esquemática de la superficie de energía escalada del modelo de AECV, que incorpora la energía de flexión según la Ec. (3.21), para los parámetros $\Gamma = 0.4$ y $\tilde{f}_r = 5.0$ (panel superior). En el panel inferior, se ofrece un resumen gráfico del proceso de autoensamblaje, en donde se destacan los puntos clave de dicho proceso.

Inicialmente, cuando las subunidades proteicas libres comienzan a unirse por fluctuaciones térmicas, forman conglomerados que, teniendo un número reducido de subunidades, se asume que parte del radio de curvatura preferencial, R_T (ver Fig. 3.1). Debido a esto, las coordenadas del inicio de autoensamblaje son $(R_r = 1, n_r \approx 0)$. A medida que las subunidades individuales colisionan con un

agregado de tamaño reducido y se adhieren a él, en términos del paisaje de energía, la cápside en formación «*viaja*» sobre la superficie energética siguiendo la TME. Posteriormente, la TME llega al punto silla, que corresponde al tamaño del núcleo crítico (punto señalado en color naranja que indica un máximo en la dirección n y un mínimo en la dirección R), y define la barrera energética en el eje n/n_T que ha de superarse para poder seguir creciendo espontáneamente (similar a la que se discute en la Sección 2.3.4).

En las coordenadas $(R_r^*, n_r^*, \Delta\mathcal{E}^*)$, que corresponden al punto de silla y que definen el tamaño crítico en este caso, una pequeña perturbación en el sistema puede hacer (i) que el agregado en cuestión continúe su autoensamblaje o (ii) que se desintegre y sus partes constituyentes vuelvan a ser libres. Más adelante, suponiendo que se ha superado la barrera de energía, el agregado alcanza el punto en color rojo con coordenadas $(R_{r\max}, n_{rc}, \Delta\mathcal{E}(R_{r\max}, n_{rc}))$,⁵ donde se pierde el confinamiento en la dirección R . A partir de ahí, el agregado toma un camino diferente, *i.e.*, la *trayectoria de compresión*. Esta curva se exhibe con una línea color cyan en la Fig. 3.3 y señala como disminuye el radio de curvatura mientras el cociente n_c/n_T se mantiene constante. La trayectoria de compresión lleva al agregado a un estado de menor energía en donde se cierra, produciendo una cápside de tamaño subóptimo. Físicamente, este proceso es debido a la tendencia a eliminar la penalización en el borde.

Cabe mencionar que, matemáticamente, el punto en color rojo representa el máximo local del valor de n_r^{TME} , y describe el número de subunidades que tendría la cápside cerrada que se ha ensamblado considerando contribuciones elásticas. Finalmente, en azul se representan las coordenadas energéticas de esta cápside completa, *i.e.*, $(R_{rc}, n_{rc}, \Delta\mathcal{E}_c)$, siendo $R_{rc} \equiv R_c/R_T$ el *radio de cierre escalado*, en donde R_c es el *radio de cierre*, y $\Delta\mathcal{E}_c \equiv \Delta\mathcal{E}(R_{rc}, n_{rc})$.

La Figura 3.4 muestra como cambia el paisaje de energía escalada variando $\tilde{f}_r$ a supersaturación fija. Se observa que, a medida que la constante de flexión aumenta, la TME tiende a acercarse al radio preferencial R_T y la cápside se cierra con un número de subunidades mayor.

El número de subunidades de la cápside completa n_{rc} , se puede determinar analíticamente como el valor máximo de la Ec. (3.23). Entonces, el problema se reduce a maximizar la Ec. (3.23) respecto a R_r , lo que permite encontrar el número de cierre escalado, n_{rc} ,

$$n_{rc} = \frac{8\tilde{f}_r^2}{\left(2^{1/3} + 2\tilde{f}_r^{2/3}\right)^3}, \quad (3.24)$$

y a partir de la condición de cierre, *i.e.*, $R_{rc} = \sqrt{n_{rc}}$, también el radio de cierre escalado, R_{rc} ,

$$R_{rc} = \frac{2\sqrt{2}\tilde{f}_r}{\left(2^{1/3} + 2\tilde{f}_r^{2/3}\right)^{3/2}}. \quad (3.25)$$

Los valores de estas cantidades, es decir, n_{rc} y R_{rc} , para distintos valores de $\tilde{f}_r$, se muestran directamente en los diferentes paneles de la Fig. 3.4. Es relevante destacar que el número y radio de cierre escalados están determinados exclusivamente por la constante de flexión, es decir, por la competición energética de las penalizaciones energéticas del borde y la flexión. La dependencia de estas cantidades en función de $\tilde{f}_r$ se muestran en la Fig. 3.5.

⁵El valor $R_{r\max}$ representa la coordenada sobre el eje R_r en donde el valor de n_r^{TME} tiene un máximo local.

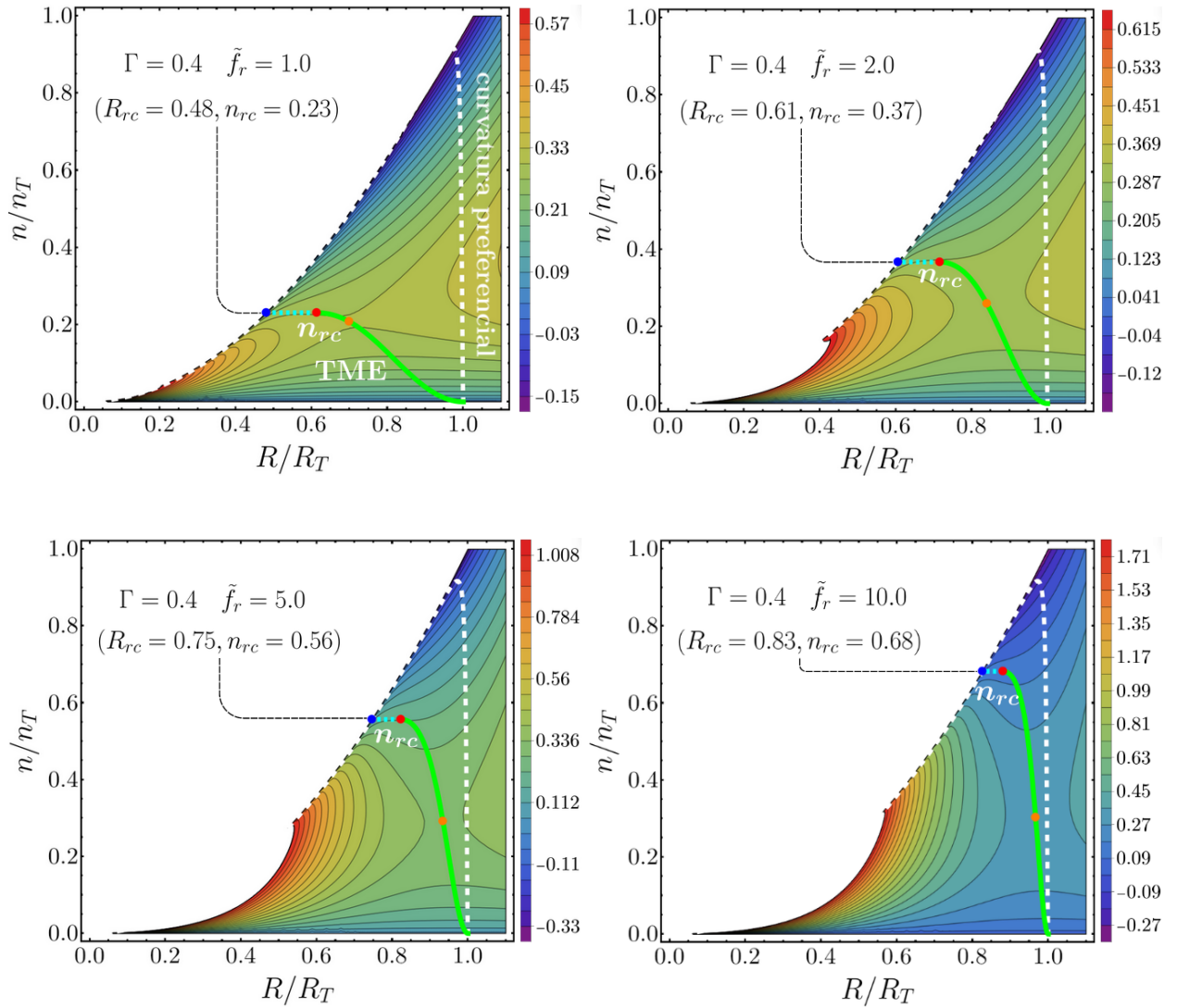


Figura 3.4: Paisaje de energía escalada de AECV con energía de flexión, Ec. (3.21), en función del número instantáneo de subunidades escalado, n/n_T , y del radio instantáneo de curvatura escalado, R/R_T , para diferentes valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$, manteniendo la supersaturación fija, *i.e.*, $\Gamma = 0.4$. En esta representación, los valores bajos de energía aparecen en color morado, mientras que los valores altos se muestran en color rojo. La línea blanca discontinua representa la «trayectoria» de una cápside que se forma siguiendo la curvatura preferencial $R = R_T$. El paisaje de energía termina en la línea negra discontinua que corresponde a la condición de cierre $R_r = \sqrt{n_r}$.

La ecuación que resulta de igualar directamente la Ec. (3.22) a cero, puede resolverse para obtener dos soluciones de R_r . En este sentido, una de las soluciones corresponde a un mínimo local; un escenario físico relevante en el AECV y que define la TME, n_r^{TME} . Por su parte, la segunda solución es un máximo local; un estado con poca transcendencia en esta investigación. En la Fig. 3.6, se muestra el comportamiento de estas dos soluciones para diferentes valores de la constante de flexión. En el panel izquierdo de dicha figura, se observa que, para el caso dominado por flexión, *i.e.*, $\tilde{f}_r = 100$, la penalización energética asociada a una cápside que se ensambla fuera de la curvatura preferencial es tan significativa que la cápside se ensambla a un radio muy cercano a R_T .

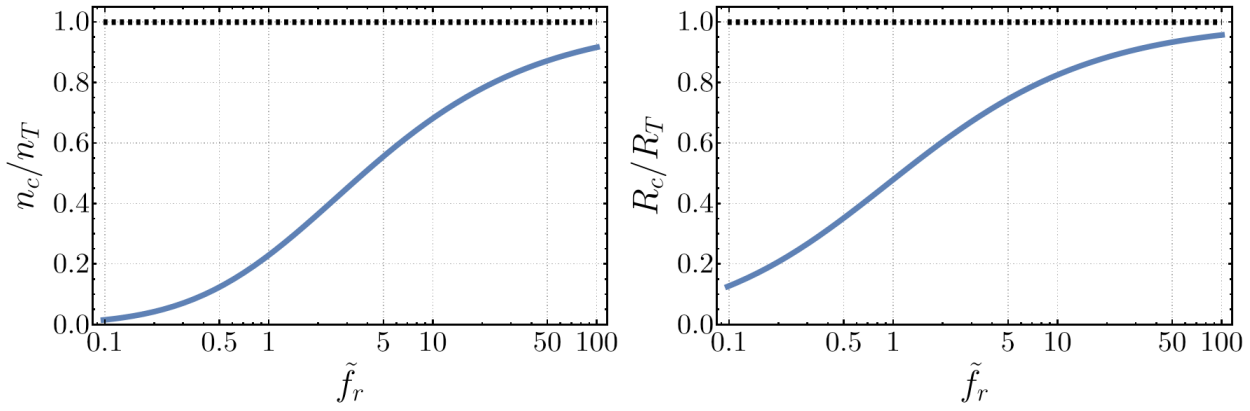


Figura 3.5: Número y radio de cierre escalados, Ecs. (3.24) y (3.25), respectivamente, en función de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$. En el panel izquierdo, se presenta la relación entre el número de subunidades con las cuales se cierra la cápside, n_c , y el número de agregación preferencial, n_T . En el panel derecho, se muestra el radio escalado al que se cierra la cápside, $R_{rc} = R_c/R_T$, a medida que $\tilde{f}_r$ aumenta. Esta figura ilustra la tendencia a ensamblar cápsides con radios más pequeños en comparación con la curvatura preferencial, R_T . La combinación de λ_T y κ influye en el AECV, lo que resulta en parámetros de cierre más pequeños de los previstos o nativos (véase en Table 3.1 de la Sección 3.9.1). El radio de curvatura preferencial, R_T y el número de agregación preferencial, n_T , se representan con una línea negra discontinua.

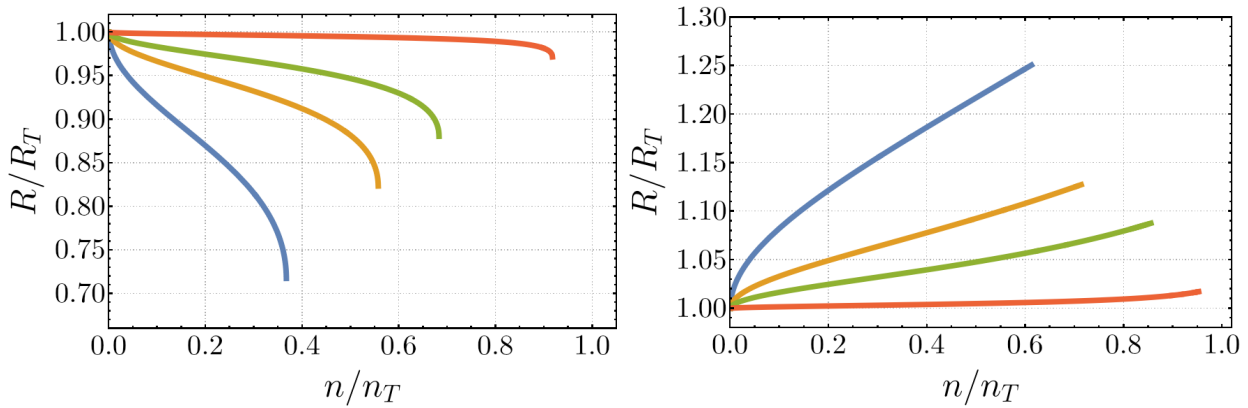


Figura 3.6: Curvas representativas de la evolución del radio de una cápside en formación en función del número escalado de subunidades, n_r , para distintos valores de la constante de flexión, *i.e.*, $\tilde{f}_r = 2.0$ (línea azul), $\tilde{f}_r = 5.0$ (línea naranja), $\tilde{f}_r = 10.0$ (línea verde), $\tilde{f}_r = 100.0$ (línea roja). Este último valor de $\tilde{f}_r$ corresponde al caso dominado por la energía de flexión, es decir, cuando $\kappa \gg \lambda_T$ (véase la Ec. (3.20)). En ambos paneles, se puede observar que, a medida que la constante de flexión aumenta, y por lo tanto la rigidez de la cápside se incrementa, el radio instantáneo del agregado tiende a R_T . Para valores pequeños de κ , el efecto de la energía de borde provoca una compresión que se traduce en la disminución del radio instantáneo de curvatura, o de forma equivalente de R_r , a medida que n_r aumenta. En el panel de la derecha se representa la localización del máximo local de energía que toma valores de R mayores a medida que la constante de flexión disminuye.

En cambio, a medida que $\tilde{f}_r$ disminuye, la competencia entre la energía de flexión y el borde conduce a la formación de cápsides virales con radios menores a los de la curvatura preferencial, como se anticipó en la Sección 3.2.3. Así mismo, se puede ver que a medida que el porcentaje de completitud aumenta, el radio disminuye cada vez más, alcanzando finalmente el radio de la cápside cerrada al final de cada línea trazada. Es evidente que el dominio de compresión está directamente relacionado con la magnitud de $\tilde{f}_r$. Por otra parte, el panel derecho, muestra los valores de la segunda solución que corresponde a un máximo local de energía y ocurre a radios $R > R_T$. Este último escenario no es físicamente relevante debido a que es energéticamente no favorable. Sin embargo, se incluye el comportamiento de la segunda solución a modo de ilustración de la función matemática.

A diferencia de la TME de la Fig. (3.2), en este sistema el autoensamblaje se describe de derecha a izquierda a lo largo de la curva verde (ver Figs. 3.3 y 3.4). Es decir, inicialmente, un agregado que cuenta con un número reducido de subunidades comienza teniendo la curvatura preferencial. Mientras se agregan más subunidades, la cápside se comprime y su radio de curvatura disminuye gradualmente hasta alcanzar el número de cierre (coordenada vertical del punto en color rojo en la Fig. 3.4). En este punto se pierde el confinamiento en R y la cápside comienza a disminuir su radio sin añadir más elementos, lo que sugiere una reconfiguración en la disposición geométrica de las subunidades proteicas. Por ejemplo, para $\Gamma = 2.78$ y $\tilde{f}_r = 7.30$, el número de cierre escalado y el radio instantáneo de curvatura escalado resultan ser $n_{rc} = 0.62$ y $R_{rc} = 0.79$, respectivamente. En otras palabras, la inclusión de la energía de flexión en estas condiciones hace que la cápside se cierre cuando tiene aproximadamente un 62 % de las subunidades de la cápside nativa y que el radio de la cápside comprimida sea aproximadamente un 21 % menor que el radio promedio de la cápside de tamaño óptimo.

3.3.1 Valores Preferenciales de Curvatura y Número de Agregación

En Busca del Virus con el Tamaño Adecuado

Los resultados del análisis gráfico de las Figs. 3.2, 3.3 y 3.4 apuntan siempre a la formación de cápsides virales vacías de tamaños subóptimos, los cuales podrían no ser adecuados para encapsular y preservar el material genético. Específicamente, se observa que las cápsides tienen (i) tamaños muy reducidos para valores pequeños de $\tilde{f}_r$ y (ii) tamaños que se aproximan cada vez más a (R_T, n_T) a medida que aumenta la constante de flexión pero que son siempre menores que el tamaño de referencia preferencial. La pregunta natural que surge de este comportamiento es: ¿Cuáles deben ser los *valores preferenciales* de curvatura y agregación para formar una cápside que, después del intrincado proceso de autoensamblaje, tenga el radio y número de subunidades adecuados, por ejemplo, correspondiente al número de triangulación del virus nativo? La manera más sencilla de responder a esta pregunta es utilizando las expresiones de los cocientes R_c/R_T y n_c/n_T .

Considere nuevamente el caso de una cápside que se autoensambla con $\Gamma = 2.78$ y $\tilde{f}_r = 7.30$. En la sección anterior, se encontró que el radio de cierre escalado de una cápside de este tipo es $R_c/R_T = 0.79$ en estas condiciones fisicoquímicas. De manera que, el nuevo radio de curvatura preferencial, R_{nT} , que debe mantener un agregado en la etapa temprana de autoensamblaje para finalmente formar una cápside con un radio R_T se calcula como (véase las Ecs. (3.24) y (3.25)) $R_{nT} = R_T/R_{rc}$. Un cálculo similar al anterior indica que el número de subunidades al que se debe apuntar al inicio del autoensamblaje es $n_{nT} = n_T/n_{rc}$.

En general, los valores preferenciales, R_{nT} y n_{nT} , de una cápside esférica pueden calcularse analíticamente como se muestra a continuación:

$$R_{nT} = \frac{(2^{1/3} + 2\tilde{f}_r^{2/3})^{3/2}}{2\sqrt{2}\tilde{f}_r} R_c, \quad \text{y} \quad n_{nT} = \frac{(2^{1/3} + 2\tilde{f}_r^{2/3})}{8\tilde{f}_r^2} n_c. \quad (3.26)$$

En resumen, debido a que R_{rc} y n_{rc} son siempre menores que 1 (consultar Fig. 3.5) y se aproximan a este valor solo cuando $\tilde{f}_r \rightarrow \infty$, se puede concluir que las subunidades proteicas han de tener un ángulo óptimo de interacción mayor que el que se observa en la cápside nativa cerrada.

La siguiente sección se centra en la estabilidad de una cápside completamente formada y la frontera que separa los estados estables y metaestables en términos de la supersaturación y la constante de flexión.

3.3.2 Estabilidad de una Cápside de Tamaño Subóptimo

Como se vio en las secciones anteriores, una cápside cerrada se encuentra definida por las coordenadas (R_{rc}, n_{rc}) y tiene una *energía libre escalada de cierre* $\Delta\mathcal{E}_c$. La estabilidad de una cápside recién formada se puede caracterizar a través del valor de la energía libre escalada, evaluada en las coordenadas de cierre. Cuando la cápside se ha cerrado (véase la Fig. 3.3), ésta se encuentra en un estado de menor en energía en comparación con los estados vecinos más próximos y aquellos definidos por el punto silla (estado metaestable) y el estado de pérdida de confinamiento en la dirección R (estado inestable). Sin embargo podría suceder que la cápside cerrada se encuentre en un estado que es menos estable (metastable) en comparación con tener las proteínas desensambladas [74]. En este ámbito, la caracterización de estabilidad se realiza a través de $\Delta\mathcal{E}_c$: Si $\Delta\mathcal{E}_c < 0$ la cápside será estable y si $\Delta\mathcal{E}_c > 0$, se considera metaestable.

Cuando la cápside se ha cerrado, la penalización energética del borde desaparece, lo que implica que la Ec. (3.21) toma la siguiente forma:

$$\Delta\mathcal{E}_c = \left[\tilde{f}_r \left(\frac{1}{R_{rc}} - 1 \right)^2 - \Gamma \right] n_{rc}. \quad (3.27)$$

Al igualar la ecuación anterior a cero es posible encontrar una relación que defina el *régimen de estabilidad* en función de Γ y $\tilde{f}_r$. A través de este argumento se obtiene, haciendo uso de las Ecs. (3.24) y (3.25), la Supersaturación Mínima de Frontera (SMF), *i.e.*,

$$\Gamma_{\text{front}} = \frac{1}{8\tilde{f}_r} \left[\left(2^{1/3} + 2\tilde{f}_r^{2/3} \right)^{3/2} - 2\sqrt{2}\tilde{f}_r \right]^2, \quad (3.28)$$

que define la *frontera de estabilidad* de cápsides cerradas. La Fig. 3.7 proporciona una representación gráfica de la frontera y las dos regiones de estabilidad. Se observa que la frontera de estabilidad depende únicamente de la constante de flexión. Para valores pequeños de $\tilde{f}_r$, se requieren grandes valores de Γ para formar cápsides estables. En contraste, cuando $\tilde{f}_r \gg 1$, prácticamente cualquier valor de la supersaturación generaría una cápside estable. Adicionalmente, utilizando las Ecs. (2.66), (3.20) y (3.28), se puede encontrar una expresión que defina la *cota superior de la diferencia de potencial químico* que garantice la formación de una cápside estable, a saber,

$$\Delta\mu_{\text{cotsup}} \equiv \frac{\pi\Delta g}{16\tilde{f}_r\sqrt{n_T}} \left[\left(2^{1/3} + 2\tilde{f}_r^{2/3} \right)^{3/2} - 2\sqrt{2}\tilde{f}_r \right]^2. \quad (3.29)$$

En la siguientes dos secciones, se aborda el estudio de la barrera de energía en la representación $(n_r R_r)$, se examinan los puntos críticos y se realiza un análisis de estas cantidades en casos límite de los parámetros físicos del sistema.

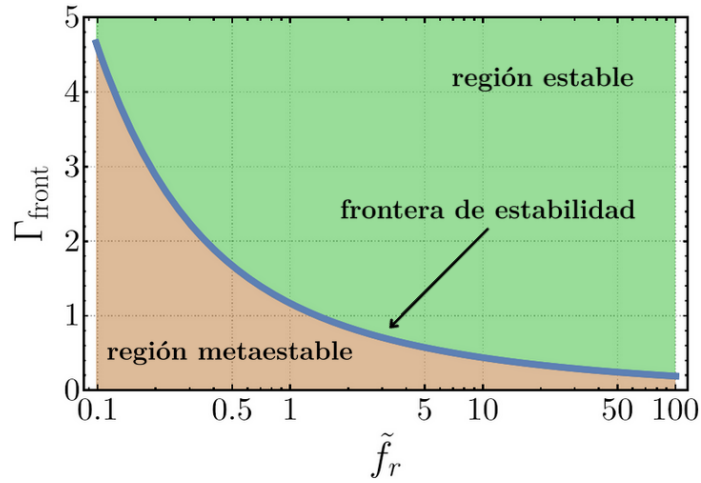


Figura 3.7: Régimen de estabilidad de cápsides virales cerradas. En verde se muestra la región de cápsides estables y en rojo la región de cápsides metaestables. En la región estable, cualquier combinación de los parámetros Γ y $\tilde{f}_r$ garantiza la formación de una cápside que, aunque de tamaño subóptimo, tendrá una energía libre (escalada) menor a cero. Por otro lado, la elección de una combinación de parámetros de la región en color rojo producirá una cápside metaestable que es energéticamente menos favorable que tener las subunidades en solución y es susceptible a desensamblarse. La línea azul representa la frontera de estabilidad, determinada por la Ec. (3.28).

3.4 La Barrera de Energía

De acuerdo con lo expuesto previamente, una superficie de energía puede tener puntos extremos que son categorizados en estables, neutros, metaestables e inestables [74]. Por ejemplo, en un sistema que tiene únicamente un grado de libertad, x , el estado estable (inestable) se identifica como el valor $x = x^*$ en el que la energía libre es un mínimo (máximo) global. En la Sección 2.3.4, se estudió el caso de una función de energía unidimensional y se determinó el punto crítico inestable n^* (*máximo global*), Ec. (2.72). En contraste, la energía libre escalada del AECV con energía de flexión, Ec. (3.21), genera una superficie de energía que involucra dos grados de libertad y un punto silla,⁶ donde, la energía libre es un máximo local en una dirección y un mínimo local en otra (ver Fig. 3.3). El propósito de esta sección es calcular analíticamente las coordenadas del punto silla de la superficie $\Delta\mathcal{E}(n_r, R_r)$ que definen el tamaño crítico en el proceso de nucleación de la cápside.

La ecuación (3.22) muestra la derivada de la energía escalada respecto a R_r , a n_r constante, después de simplificar el resultado. De la misma manera, al derivar $\Delta\mathcal{E}(n_r, R_r)$ respecto a n_r con R_r constante se obtiene

$$\left(\frac{\partial\Delta\mathcal{E}(n_r, R_r)}{\partial n_r}\right)_{R_r} = \tilde{f}_r \left(\frac{1}{R_r} - 1\right)^2 - \Gamma + \frac{R_r^2 - 2n_r}{2R_r \sqrt{n_r(R_r^2 - n_r)}}. \quad (3.30)$$

Al igualar las Ecs. (3.22) y (3.30) a cero, se obtiene un sistema de ecuaciones que permite determinar las coordenadas del punto silla, $R_r = R_r^*$ y $n_r = n_r^*$, a saber,

$$2\tilde{f}_r(R_r^* - 1) - \frac{n_r^* R_r^* \sqrt{\frac{R_r^{*2}}{n_r^*} - 1}}{n_r^* - R_r^{*2}} = 0, \quad \tilde{f}_r \left(\frac{1}{R_r^*} - 1\right)^2 - \Gamma + \frac{R_r^{*2} - 2n_r^*}{2R_r^* \sqrt{n_r^*(R_r^{*2} - n_r^*)}} = 0. \quad (3.31)$$

⁶En un sistema en donde la energía libre o energía potencial depende de múltiples grados de libertad, la superficie de energía puede tener varios puntos extremos.

Al resolver algebraicamente dicho sistema, se encuentran las coordenadas del punto silla, o de forma equivalente, el *tamaño crítico*, n_r^* y el *radio crítico de curvatura* R_r^* , en su forma adimensional. Estas cantidades tienen la siguiente forma:

$$R_r^* = \frac{1 + 4\tilde{f}_r(2\tilde{f}_r - \Gamma) - \zeta}{8\tilde{f}_r(\tilde{f}_r - \Gamma)}, \quad n_r^* = \frac{\zeta - 1 + 4\tilde{f}_r[\Gamma + \tilde{f}_r(\zeta - 4\tilde{f}_r\Gamma - 3)]}{8\zeta(\tilde{f}_r - \Gamma)^2}, \quad (3.32)$$

en donde se ha definido

$$\zeta \equiv \sqrt{1 + 8\tilde{f}_r[2\tilde{f}_r(1 + \Gamma^2) - \Gamma]}. \quad (3.33)$$

Las gráficas representativas de R_r^* y n_r^* se presentan en la Fig. 3.8 en función de la constante de flexión para diferentes valores de la supersaturación. Es importante, además, analizar el comportamiento de las coordenadas del punto silla en función de la supersaturación para diferentes valores de la constante de flexión. Esto permite una comparación más directa con los resultados del capítulo anterior. Por esta razón, en la Fig. 3.9 se muestran las gráficas representativas de estas cantidades en función de Γ . En ellas se puede observar cómo las coordenadas del tamaño crítico n_r^* y R_r^* del AECV con energía de flexión se aproximan a las del modelo presentado en el Capítulo 2 para valores grandes de $\tilde{f}_r$. Por conveniencia, y con el fin de referenciar a éste de forma simple, el modelo de AECV del Capítulo 2 será llamado a partir de ahora «*modelo clásico*».

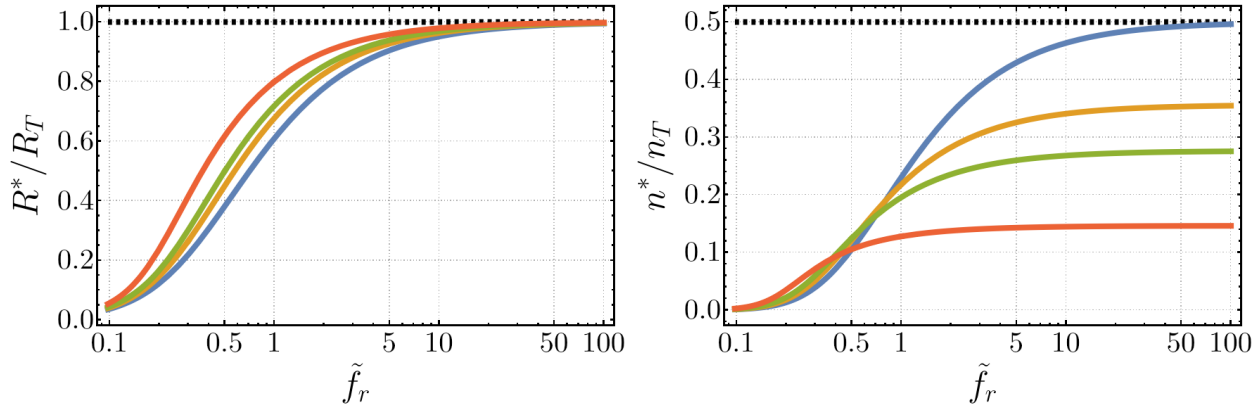


Figura 3.8: Tamaño crítico y radio crítico escalados, Ec. (3.32), en función de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$, para diferentes valores de la supersaturación, Γ . En el panel izquierdo, se muestra el radio crítico escalado, R_r^* , mientras que en el panel derecho se presenta el comportamiento de n_r^* . Se puede observar que el radio de curvatura crítico, R_r^* , tiende a su valor preferencial, *i.e.*, R_T , a la vez que el número crítico de subunidades, n_r^* , tiende a $n_T/2$, a medida que $\tilde{f}_r$ aumenta. Para la generación de los dos gráficos se utilizaron los siguientes valores de la supersaturación: $\Gamma = 0.0$ (línea azul), $\Gamma = 0.3$ (línea naranja), $\Gamma = 0.5$ (línea verde), $\Gamma = 1.0$ (línea roja). El radio de curvatura preferencial, R_T , y el número $n_T/2$, se representan con una línea negra discontinua.

La evaluación de la energía libre escalada, Ec. (3.21), en las coordenadas del punto silla, Ec. (3.32), conduce a la altura de la barrera de energía, *i.e.*,

$$\Delta\mathcal{E}^* \equiv \Delta\mathcal{E}(n_r^*, R_r^*)$$

$$= \frac{\zeta - 1 - 4\tilde{f}_r\Gamma(\zeta - 4\tilde{f}_r\Gamma) + 2\sqrt{\zeta - (1 - 4\tilde{f}_r\Gamma)}\sqrt{\zeta - 1 + 4\tilde{f}_r[\tilde{f}_r(\zeta - 4\tilde{f}_r\Gamma - 3) + \Gamma]}}{8\zeta(\tilde{f}_r - \Gamma)}. \quad (3.34)$$

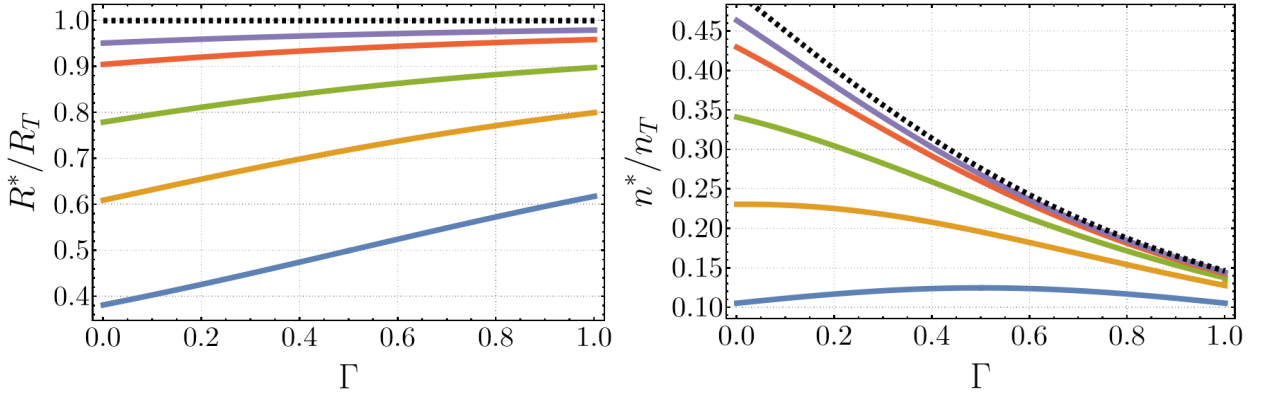


Figura 3.9: Tamaño crítico y radio crítico escalados, Ec. (3.32), en función de la supersaturación, Γ , para distintos valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$. En el panel izquierdo, se encuentra el comportamiento del radio crítico escalado, R^*/R_T . Puede observarse que tiende hacia la curvatura preferencial (al caso dominado por la flexión, *i.e.*, al caso clásico representado por la línea negra discontinua) para valores grandes de $\tilde{f}_r$. En el panel derecho, se presenta el número crítico de subunidades y se observa cómo se recupera el resultado clásico a medida que $\tilde{f}_r \rightarrow \infty$. Las dos gráficas se generaron con los siguientes valores de la constante de flexión: $\tilde{f}_r = 0.5$ (línea azul), $\tilde{f}_r = 1.0$ (línea naranja), $\tilde{f}_r = 2.0$ (línea verde), $\tilde{f}_r = 5.0$ (línea roja) y $\tilde{f}_r = 10.0$ (línea morada).

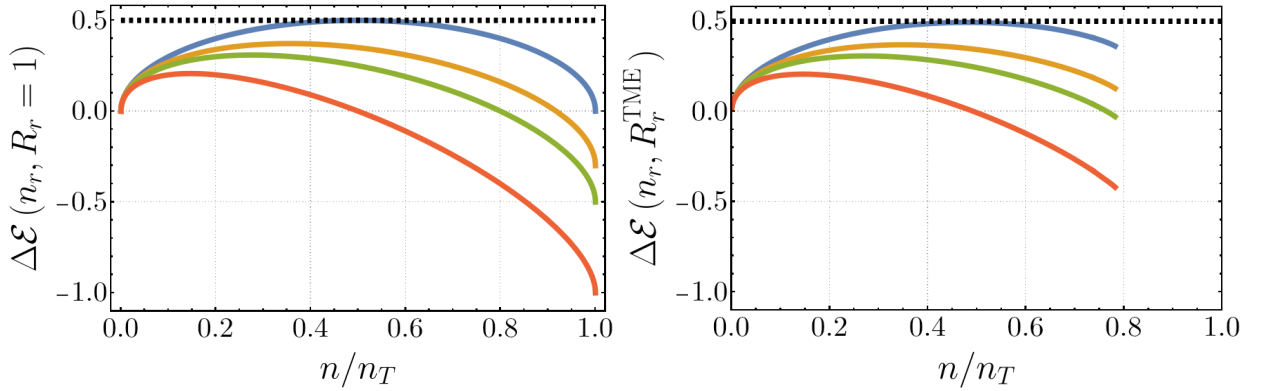


Figura 3.10: Energía escalada de autoensamblaje, Ec. (3.21), evaluada en dos diferentes radios de curvatura, *i.e.*, $R_r = 1, R_r^{\text{TME}}$, para una cápside con $n_T = 120$. En el panel izquierdo, se muestra el comportamiento de la energía escalada de una cápside que crecen con un radio de curvatura fijo igual al radio preferencial, R_T , mientras que en el panel derecho se presentan las curvas representativas de $\Delta \mathcal{E}(n_r, R_r^{\text{TME}})$, es decir, la energía de autoensamblaje evaluada en el radio escalado que define la TME, R_r^{TME} , es decir, en la solución de la Ec. 3.23. Estas funciones se grafican en función del número de subunidades escalado, n/n_T , para diferentes valores de la supersaturación (véase la Ec. (3.113)): $\Gamma = 0.0$ (línea azul), $\Gamma = 0.3$ (línea naranja), $\Gamma = 0.5$ (línea verde) y $\Gamma = 1.0$ (línea roja). Particularmente se ha utilizado $\tilde{f}_r = 20$ para las curvas del panel derecho. En ambos casos, la altura de la barrera de energía en el caso clásico y en ausencia de potencial químico se representa mediante una línea negra discontinua.

En el panel izquierdo de la Figura 3.10, se muestra el comportamiento del paisaje de energía escalada, $\Delta\mathcal{E}(n_r)$, para diferentes valores de la supersaturación si la formación de la cápside ocurriese con un radio igual al radio preferencial, *i.e.*, siguiendo la línea blanca en la Fig. 3.4. Este escenario es equivalente al modelo clásico representado en el panel derecho de la Figura 2.3. La razón radica en que si una cápside sigue la curvatura preferencial, la energía de flexión desaparece (véase la Ec. (3.14)), dejando únicamente al potencial químico y la tensión lineal como los parámetros que determinan las vías de autoensamblaje.

En el panel derecho de la Figura 3.10, se representa el paisaje de energía escalada de una cápside que sigue la TME, es decir, R_r^{TME} , que corresponde a la línea verde de la Fig. 3.4. En este segundo caso, se puede observar más directamente el efecto de la energía de flexión: a medida que la constante de flexión aumenta, también lo hace la altura de la barrera de energía, es decir, los máximos locales de la superficie de energía. En otras palabras, cuanto más rígida sea la cápside, más energía se requiere para desviarse hacia curvaturas diferentes valores de R_T , y al mismo tiempo se necesita un mayor número de subunidades proteicas para formar un núcleo.

La solución analítica de las coordenadas (R_r^*, n_r^*) permite obtener el tamaño del núcleo crítico en términos del (i) número de subunidades y (ii) el radio de curvatura preferencial, es decir, n_T y R_T . Además, estas expresiones permiten estimar cómo las propiedades del núcleo crítico dependen de los parámetros físicos relevantes, como son la supersaturación, Γ , y la constante de flexión, $\tilde{f}_r$, con el objetivo de garantizar o frustrar la formación de una cápside completa en un marco experimental o computacional.

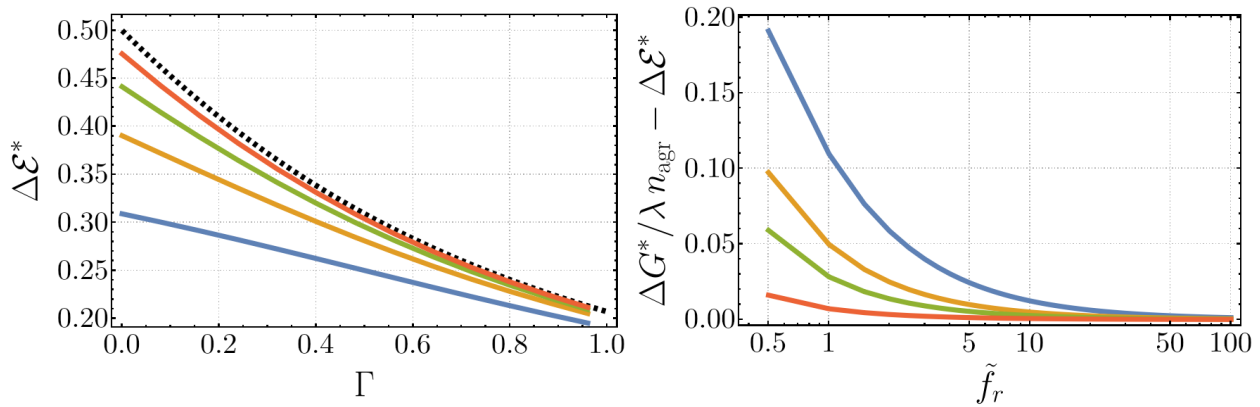


Figura 3.11: El panel izquierdo muestra la representación gráfica de la altura de la barrera de energía escalada del AECV con energía de flexión, Ec. (3.34), en función de la supersaturación, Γ , para diferentes valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$, a saber, $\tilde{f}_r = 0.5$ (línea azul), $\tilde{f}_r = 1.0$ (línea naranja), $\tilde{f}_r = 2.0$ (línea verde) y $\tilde{f}_r = 5.0$ (línea roja). La curva que describe la altura de la barrera de energía del caso clásico, en su versión adimensional (dividida por $\lambda_T n_{\text{agr}}$), se representa como una línea negra discontinua. El panel derecho presenta la diferencia entre las barreras de energía del AECV del modelo clásico, Ec. (2.73) (dividida por el producto $\lambda_T n_{\text{agr}}$), y del sistema con energía de flexión, Ec. (3.34), *i.e.*, $\Delta G^* / \lambda_T n_{\text{agr}} - \Delta\mathcal{E}^*$, en función de $\tilde{f}_r$ para diferentes valores de Γ : $\Gamma = 0.0$ (línea azul), $\Gamma = 0.3$ (línea naranja), $\Gamma = 0.5$ (línea verde) y $\Gamma = 1.0$ (línea roja).

En la Figura 3.11, se muestra la altura de la barrera de energía en función de la supersaturación para diferentes valores de $\tilde{f}_r$, así como la diferencia entre la altura de la barrera en el caso clásico y con energía de flexión, $\Delta G^*/\lambda n_{\text{agr}} - \Delta \mathcal{E}^*$, *i.e.*, la diferencia entre las Ecs. (2.73) (dividida por el producto λn_{agr}) y (3.34), respectivamente. Esta diferencia se presenta en su forma adimensional y se grafica en función de $\tilde{f}_r$ para distintos valores de Γ . Esta representación permite caracterizar cómo disminuye el efecto de la energía de flexión a medida que $\tilde{f}_r$ toma valores significativamente altos en comparación con $\Delta\mu$ o λ_T . Puede observarse que, en todos los casos, la altura de la barrera de energía con flexión es más baja que en el modelo clásico.

A diferencia del «modelo clásico» del capítulo anterior, en el AECV con energía de flexión son dos los parámetros escalados que controlan la formación de cápsides, a saber: (i) la supersaturación, Γ , y (ii) constante de flexión, $\tilde{f}_r$.

3.4.1 Desaparición del Punto Crítico

El AECV se ha caracterizado en función de los parámetros adimensionales Γ y $\tilde{f}_r$ que exhiben el efecto de competición energética. Sin embargo, es interesante estudiar qué sucede con las condiciones de autoensamblaje cuando uno de los parámetros mencionados anteriormente se mantiene fijo mientras el otro toma un valor extremo, ya sea muy grande o muy pequeño.

En la Fig. 3.12, se muestran los paisajes de energía libre escalada en el estado en donde una subunidad que forma parte de la cápside tiene la misma energía que en solución, esto es con $\Gamma = 0.0$, para diferentes valores de la constante de flexión. A medida que la constante de flexión disminuye, se observa un traslape entre el punto que describe al máximo de la TME y las coordenadas del punto silla, (R_r^*, n_r^*) . Específicamente, se ve que, a medida que $\tilde{f}_r$ disminuye, el punto en color naranja, correspondiente al tamaño crítico, se aproxima al punto en color rojo, que indica la pérdida de confinamiento en la dirección radial, (cuadrante (i)). Luego, el punto en color rojo se superpone con el naranja, lo que corresponde a que $n_{rc} \approx n_r^*$ y $R_{rc} \approx R_r^*$ (cuadrante (ii)). Posteriormente, cerca de $\tilde{f}_r \approx 0.14$, y para valores menores a este, el punto silla desaparece y es sustituido por un punto en donde hay un máximo local tanto en la dirección n como en la dirección R , lo que se representa con un punto en color magenta en los cuadrantes (iii) y (iv). Este fenómeno, donde el punto silla pasa a ser un punto máximo en la vecindad de los puntos circundantes en todas las direcciones, se denomina la *desaparición del punto crítico*.

En general, la desaparición del punto crítico se observa para valores pequeños de $\tilde{f}_r$ en comparación con Γ . La magnitud o escala de qué tan pequeño debe ser $\tilde{f}_r$ para observar este fenómeno depende fuertemente del valor inicial de Γ . Más específicamente, a medida que Γ aumenta, el rango de valores de $\tilde{f}_r$ donde se observa la desaparición del punto crítico, es decir, $n_r^* - n_c \ll 0$, disminuye. Más aún, cuando $\tilde{f}_r \rightarrow 0$, la compresión de la cápside en formación es tan pronunciada que la estructura final tiende a ser del tamaño de una subunidad libre. En contraste, cuando $\tilde{f}_r \rightarrow \infty$, las estructuras no experimentan compresión y la cápside se autoensambla con el número de subunidades y la curvatura preferencial.

La desaparición del punto crítico implica la pérdida de la noción física del tamaño crítico. En estas condiciones el punto crítico corresponde a un máximo local del paisaje de energía, tanto en la dirección n como en la dirección R . La energía crece directamente hasta que un agregado forma una cápside metaestable. El sistema no transita por este máximo, sino que la cápside parcial «bordea» el máximo en la dirección R , a través de la línea cyan discontinua, hasta cerrarse.

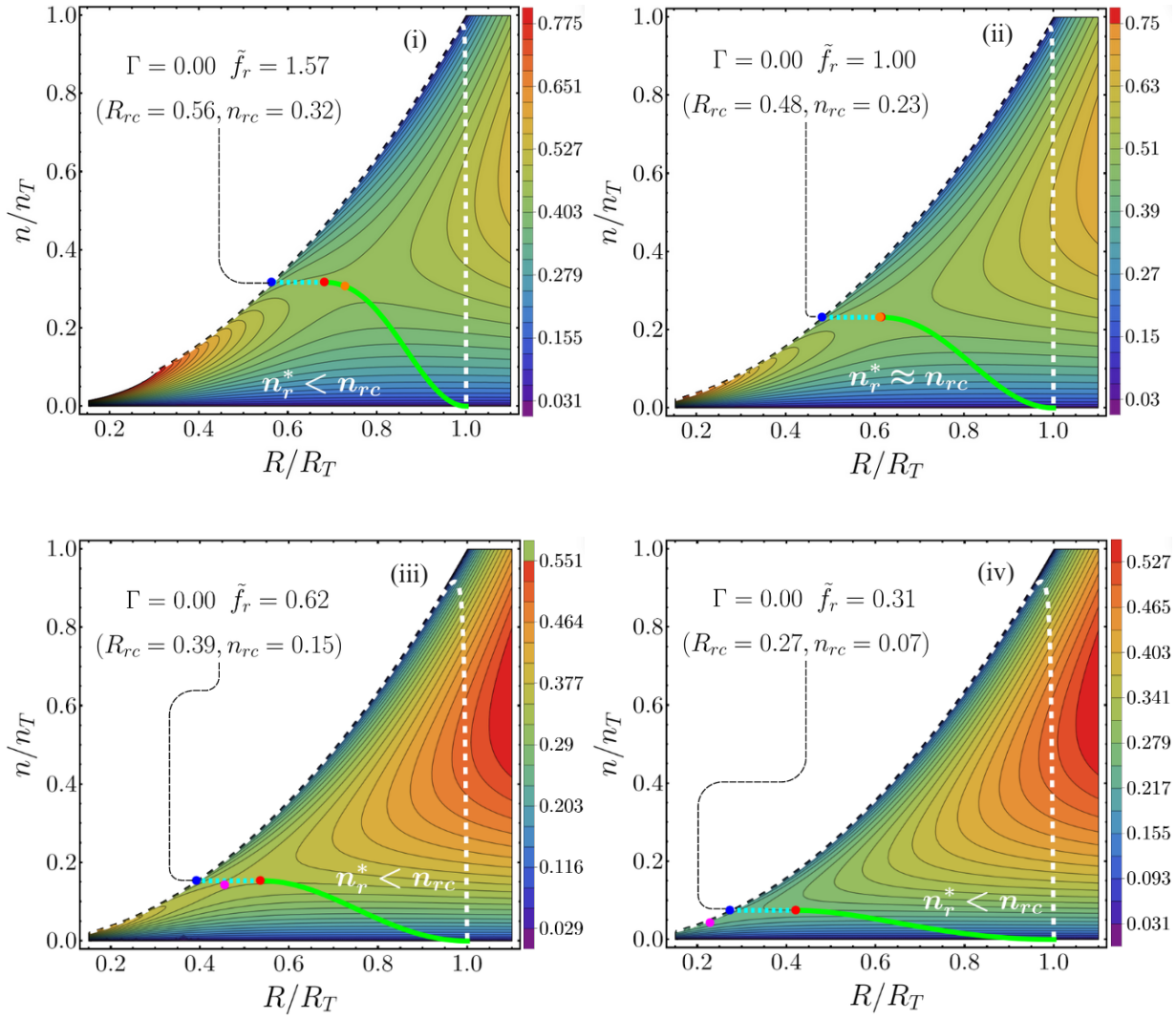


Figura 3.12: Paisaje de energía escalada del modelo de AECV con energía de flexión, Ec. (3.21), en función del número escalado de subunidades, n/n_T , y de el cociente R/R_T para $\Gamma = 0.0$ y valores pequeños de la constante de flexión $\tilde{f}_r$. El código de color y el significado de las líneas sobre la superficie de energía coinciden con lo descrito en la Figura 3.4.

3.4.2 Casos Límite

Las coordenadas del tamaño crítico, Ec. (3.32), y de la altura de la barrera de nucleación, Ec. (3.34), para valores extremos de Γ , *i.e.*, cuando $\Gamma \ll 1$ o $1/\Gamma \ll 1$, son importantes para analizar el marco teórico y su rango de aplicabilidad.⁷ Considere entonces el *estado de equilibrio*, *i.e.*, $\Delta\mu = 0.0 k_B T$. En este estado de equilibrio, no hay ninguna ventaja energética entre el estado libre y de agregación. En este caso, el trabajo total de formación de un intermediario de tamaño n tiene únicamente dos contribuciones: (i) la energía de flexión (segundo término de la Ec. (3.21)) y (ii) la energía de borde

⁷Las modificaciones a estas cantidades para valores extremos de $\tilde{f}_r$ se puede deducir fácilmente del comportamiento gráfico presentado en las Figs. 3.9, 3.10 y 3.11 (panel izquierdo). Concretamente, se recuperan los resultados del modelo clásico, *i.e.*, Ecs. (2.72) y (2.73), para n^* y ΔG^* cuando $\tilde{f}_r \rightarrow \infty$. En este mismo límite, el radio instantáneo de curvatura tiende al radio de curvatura preferencial, y por lo tanto no hay compresión de la cápside en el autoensamblaje. Por otro lado, si $\tilde{f}_r \rightarrow 0$, tanto el tamaño del núcleo crítico como su radio tienen a cero, como se observa en la Fig. 3.9.

(tercer término de dicha ecuación). Por lo tanto, el radio crítico de curvatura escalado, R_r^* , se reduce a la siguiente expresión:

$$R_r^*_{\Delta\mu=0} = 1 + \frac{1 - \zeta_0}{8\tilde{f}_r^2}, \quad (3.35)$$

mientras que el número crítico de subunidades escalado, n_r^* , se escribe como

$$n_r^*_{\Delta\mu=0} = \frac{1}{2} + \frac{\zeta_0 - 1 - 12\tilde{f}_r^2}{8\tilde{f}_r^2\zeta_0}, \quad (3.36)$$

siendo $\zeta_0 \equiv \sqrt{1 + 16\tilde{f}_r^2}$ el valor del parámetro auxiliar ζ definido en la Ec. (3.33) cuando $\Gamma = 0.0$. Por un lado, el primer término, tanto de la Ec. (3.35) como de la Ec. (3.36), representa los resultados obtenidos en el modelo clásico de AECV (véase la Ec. (2.75)). Por otro lado, el segundo término en cada una estas ecuaciones refleja el efecto de competición entre las penalizaciones energéticas. La altura de la barrera de energía escalada en este límite toma la siguiente forma:⁸

$$\Delta\mathcal{E}^*_{\Delta\mu=0} = \frac{\sqrt{\zeta_0 - 1}}{8\tilde{f}_r\zeta_0} \left[2\sqrt{4\tilde{f}_r^2(\zeta_0 - 3) + \zeta_0 - 1} + \sqrt{\zeta_0 - 1} \right]. \quad (3.37)$$

En concordancia con el modelo clásico, los agregados intermediarios con un tamaño escalado n_r mayor que n_r^* experimentarán una reducción en la energía libre al añadir más subunidades, lo que les permitirá crecer en la dirección n_r y cubrir un mayor grado de completitud, a medida que el radio instantáneo de curvatura disminuye progresivamente. En la Fig. 3.13, se muestran las curvas representativas del número de subunidades del núcleo crítico (panel izquierdo) y la altura de la barrera de energía escalada (panel derecho) en función de $\tilde{f}_r$ para $\Gamma = 0.0$ ($\Delta\mu = 0.0 k_B T$) y $\Gamma = 0.2$ ($\Delta\mu < 0.0 k_B T$). Además, se presenta la convergencia de estas cantidades hacia los resultados de la Sección 2.3.4 para valores grandes de la constante de flexión.

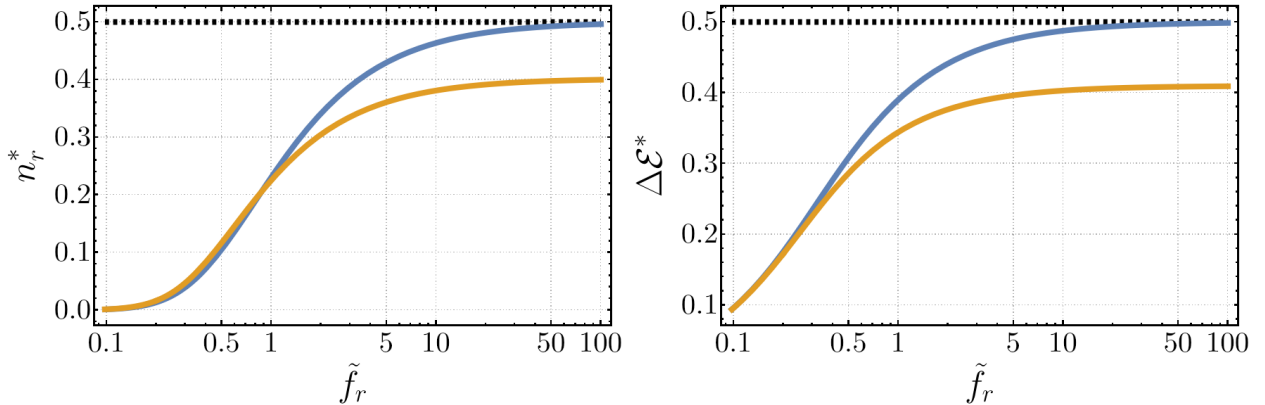


Figura 3.13: Representación esquemática del número crítico de subunidades, n_r^* (panel izquierdo), y la altura de la barrera de energía escalada, $\Delta\mathcal{E}^*$ (panel derecho), en el estado de equilibrio, *i.e.*, con $\Delta\mu = 0.0 k_B T$ ($\Gamma = 0.0$) (línea azul) y en el estado supersaturado, es decir, $\Delta\mu < 0.0 k_B T$ (en donde a manera de ejemplo se utilizó $\Gamma = 2.0$) (línea naranja), en función de $\tilde{f}_r$. En ambos casos, los resultados obtenidos en el modelo clásico con $\Gamma = 0.0$, Ecs. (2.75) y (2.76), respectivamente, se representan con una línea negra discontinua.

⁸Cabe mencionar que si $\Gamma = 0.0$, los dos términos restantes en la energía libre de autoensamblaje son positivos (ver Ec. (3.21)), por lo tanto, una cápside cerrada en estas condiciones será metaestable, es decir, tendrá una energía libre escalada de cierre que es mayor que en el estado desensamblado.

En la Fig. 3.13, se puede observar que cuando $\Delta\mu = 0.0 k_B T$, la barrera de energía está situada en una cápside intermedia que contiene menos de la mitad de las subunidades requeridas para alcanzar el tamaño preferencial, es decir, $n^* < n_T/2$ (ver la Ec. (3.36)). Por su parte, cuando el potencial químico es negativo ($\Delta\mu < 0.0 k_B T$) la altura de la barrera de energía escalada disminuye. En conclusión, fuera del equilibrio, el número de subunidades requeridas para formar al núcleo disminuye y el radio instantáneo de curvatura siempre se comprime. Para valores grandes (muy negativos) de Γ ($\Delta\mu$), la barrera de energía puede ser lo suficientemente pequeña para impulsar el autoensamblaje de una cápside viral vacía con energía de flexión hacia tamaños subóptimos.

Los valores altos de supersaturación, *i.e.*, $\Delta\mu \ll 0$, se corresponden de acuerdo con la Ec. (3.20), *i.e.*,

$$\frac{1}{\Gamma} \ll 1, \quad (2.77)$$

de manera que el radio crítico de curvatura escalado se escribe como:

$$R_r^* = 1 - \frac{1}{8\pi\Gamma\tilde{f}_r}, \quad (3.38)$$

mientras que el tamaño crítico, Ecs. (3.32) (lado derecho), y la altura de la barrera, (3.34), toman la forma exacta de las igualdades presentadas en la Ec. (2.81). El término $1/8\pi\Gamma\tilde{f}_r$ en la Ec. (3.38) indica que cualquier valor de la supersaturación y la constante de flexión resulta en una disminución del radio de curvatura.

De acuerdo con estos resultados, una mayor disponibilidad de subunidades proteicas en solución facilita la formación de núcleos y su crecimiento posterior. Más aún, la presencia de la energía de flexión moderada reduce el tamaño del núcleo crítico. Esto a su vez, acelera la producción de embriones de cápsides en una solución. La verificación de la aceleración de la producción de núcleos en presencia de la energía de flexión se aborda en la siguiente sección, donde se calcula analíticamente el ritmo de nucleación en el estado estacionario del AECV considerando la energía de flexión.

3.5 Cinética del Autoensamblaje de Cápsides Virales con Energía de Flexión

Tal como se mencionó en la Sección 3.2, la energía libre de formación de cápsides virales con energía de flexión ha sido estudiada anteriormente por M. Hagan y G. Grason [36], en el contexto de autoensamblaje autolimitante, y por C. Mendoza y D. Reguera [43], que analizaron cuáles son las formas óptimas de los ensamblados. En ningún caso de los anteriores se trataron los aspectos cinéticos del AECV. En esta sección, se presentan los fundamentos matemáticos para calcular analíticamente la tasa de nucleación (o ritmo de autoensamblaje) de un sistema cuya energía libre depende de dos variables. Para ello, se emplean las herramientas de la TCN de sistemas multicomponentes.

Un agregado intermedio compuesto de n subunidades y con un radio de curvatura R , experimenta cambios en su tamaño y curvatura a medida que las subunidades proteicas libres chocan con él. Suponga entonces que el ritmo al que las subunidades se adhieren a un agregado de tamaño $\{n, R\}$ se denota como $\beta_{n\{n,R\}}(t)$, mientras que el ritmo al que dichas subunidades se disocian es $\gamma_{n\{n,R\}}(t)$. Adicionalmente, suponga que los cambios en el radio instantáneo de curvatura, aunque puede variar en un espectro continuo, son discretos. Es decir, una cápside con un radio R solo puede aumentar o disminuir su radio de curvatura en pasos de tamaño δR , por lo que $R = h \delta R$, en donde $h = 1, 2, 3, \dots$. De esta manera, el ritmo al que la curvatura instantánea aumenta y disminuye se representa como $\beta_h\{n,R\}(t)$ y $\gamma_h\{n,R\}(t)$, respectivamente.

En la Fig. 3.14, se muestra una representación esquemática de la variación discreta de la curvatura instantánea de una cápside en formación.

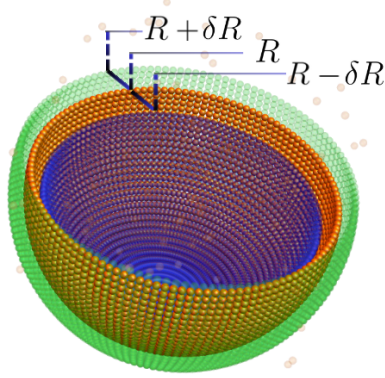


Figura 3.14: Representación esquemática del aumento y disminución discreta del radio de curvatura de un agregado de tamaño $\{n, R\}$. En naranja, se muestra un agregado intermedio con radio R , en azul, uno con radio $R - \delta R$ y en verde, uno con radio $R + \delta R$.

La concentración de agregados con un número específico de subunidades, n , y cierto radio de curvatura, R , puede cambiar por alguna de las siguientes razones: Un agregado $\{n, R\}$ puede convertirse en un agregado intermedio de tamaño $\{n - 1, R\}$ ($\{n, R - \delta R\}$) o $\{n + 1, R\}$ ($\{n, R + \delta R\}$) al perder (disminuir) o ganar (aumentar) su número de subunidades (radio de curvatura). Análogamente, se puede obtener un agregado de tamaño $\{n, R\}$ al añadir (aumentar) o sustraer (disminuir) una subunidad (la curvatura) de un agregado de tamaño $\{n - 1, R\}$ ($\{n, R - \delta R\}$) o $\{n + 1, R\}$ ($\{n, R + \delta R\}$), respectivamente.⁹ De esta manera, el cambio en el tiempo de la población o concentración de agregados de tamaño $\{n, R\}$, $c_{\{n, R\}}$, se obtiene particularizando $l = n, h$ en la ecuación maestra generalizada presentada en la Sección 2.4.1, Ec. (2.86).

Por lo tanto, la ecuación maestra que describe los cambios en la concentración de agregados de tamaño $\{n, R\}$ del modelo de AECV con energía de flexión es

$$\frac{dc_{\{n, R\}}}{dt} = I_{n\{n-1, R\}}(t) - I_{n\{n, R\}}(t) + I_{h\{n, R-\delta R\}}(t) - I_{h\{n, R\}}(t), \quad (3.39)$$

siendo

$$I_{n\{n, R\}} = \beta_{n\{n, R\}}(t) c_{\{n, R\}}(t) - \gamma_{n\{n+1, R\}}(t) c_{\{n+1, R\}}(t), \quad (3.40)$$

la corriente neta de agregados de tamaño $\{n, R\}$ en la dirección n (véase la Ec. (2.85)). La expresión de la corriente $I_{h\{n, R\}}$ en la dirección h tiene exactamente la misma estructura matemática que la ecuación anterior. La única diferencia radica en que hay que sustituir las tasas de cambio por aquellas que describen el aumento o la disminución discreta del radio de curvatura, *i.e.*, $\beta_{h\{n, R\}}$ y $\gamma_{h\{n, R\}}$.

La formación de un nuevo agregado a través de la unión o separación de subunidades proteicas, así como debido al aumento o disminución del radio de curvatura, se representa esquemáticamente en la Fig. 3.15.

⁹Para simplificar el desarrollo teórico, se considera un tamaño de paso de δR en todo el proceso, aunque en realidad puede ser tan pequeño como se desee. De esta forma, se modela el ritmo de autoensamblaje de manera análoga a la formulación de J en presencia de dos especies de subunidades, *i.e.*, n y h . Por último, será necesario emplear el límite continuo, como se hizo a partir de la Ec. (2.105) en la Sección 2.4.2. Esto justifica la suposición de que el radio aumenta de forma discreta, ya que finalmente podrá tomar valores dentro de un espectro continuo.

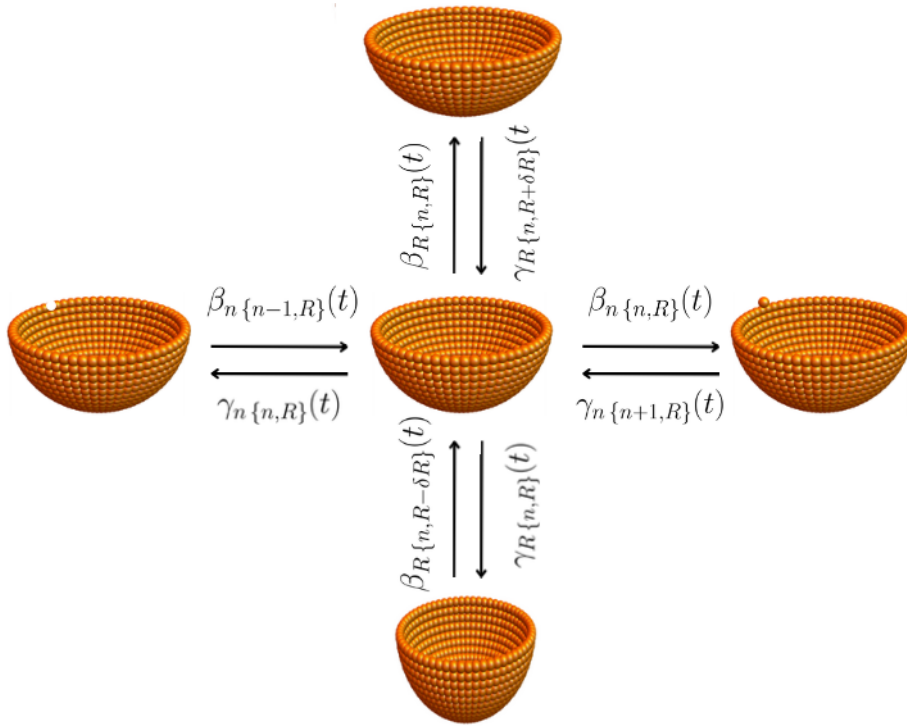


Figura 3.15: Representación esquemática del flujo de tamaños de agregados en la dirección de n (horizontal) y R (vertical). Por un lado, el ritmo de unión y separación de subunidades proteicas está dado por $\beta_{n\{n,R\}}(t)$ y $\gamma_{n\{n,R\}}(t)$, respectivamente. Por otro lado, $\beta_{h\{n,R\}}(t)$ y $\gamma_{h\{n,R\}}(t)$ representan los ritmos de crecimiento y disminución del radio de curvatura.

En el centro de la figura se observa un agregado de tamaño $\{n, R\}$. A la derecha (izquierda) de este, se representa a un agregado de tamaño $\{n+1, R\}$ ($\{n-1, R\}$), que tiene una subunidad más (menos). En la dirección vertical, se puede observar que por arriba (abajo) del agregado central, se encuentra una cápside parcialmente formada con un radio mayor (menor) comparado con el de la estructura principal. Figura basada en [107].

En el límite continuo, la Ec. (3.39) se escribe como sigue:

$$\frac{\partial c_{\{n,R\}}(t)}{\partial t} \approx -\frac{\partial I_n\{n,R\}}{\partial n} - \frac{\partial I_h\{n,R\}}{\partial h}. \quad (3.41)$$

Esta expresión puede deducirse fácilmente aplicando la definición de derivada:

$$\frac{\partial I_k\{k,j\}}{\partial k} = \lim_{\Delta k \rightarrow 0} \frac{I_k\{k+\Delta k,j\} - I_k\{k,j\}}{\Delta k}, \quad (3.42)$$

donde $k = n, h$ y Δk representa el cambio discreto en la especie k (que en ambos casos es unitario). Si se desea expresar la variación temporal de los agregados de tamaño $\{n, R\}$ en términos de derivadas respecto a R en lugar de h , simplemente se requiere aplicar la regla de la cadena. De este modo, la Ec. (3.41) se expresa como se muestra a continuación

$$\frac{\partial c_{\{n,R\}}(t)}{\partial t} \approx -\frac{\partial I_n\{n,R\}}{\partial n} - \frac{\partial I_R\{n,R\}}{\partial R}, \quad (3.43)$$

en donde

$$I_R\{n,R\} \equiv \delta R I_h\{n,R\} = \delta R \beta_{h\{n,R\}}(t) c_{\{n,R\}}(t) - \delta R \gamma_{h\{n,R+\delta R\}}(t) c_{\{n,R+\delta R\}}(t). \quad (3.44)$$

Es importante mencionar que el dominio de los grados de libertad n y R son $[1, n_c]$ y $[\sqrt{n}, \infty]$, respectivamente, los cuales tienen asociadas las siguientes condiciones a la frontera: $\beta_{n\{n_c, R_c\}} = \gamma_{n\{1, R_T\}} = 0$ y $\beta_{h\{n, R \rightarrow \infty\}} = \gamma_{h\{n_c, \sqrt{n_c}\}} = 0$.

Ahora se introduce el operador de divergencia, $\nabla \cdot$, en la forma de un vector renglón, *i.e.*,

$$\nabla \cdot \equiv \left(\frac{\partial}{\partial n}, \frac{\partial}{\partial R} \right) \cdot, \quad (3.45)$$

y el vector de corriente neta $\mathbf{I}$, como un vector columna con componentes en la dirección n y R , es decir,

$$\mathbf{I} \equiv \begin{pmatrix} I_n \\ I_R \end{pmatrix}. \quad (3.46)$$

Esta es la notación utilizada típicamente en la TCN de sistemas multicomponentes [78, 107-109]. Con estas definiciones, la Ec. (3.41) toma la siguiente forma:

$$\frac{\partial c_{\{n, R\}}(t)}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{I}. \quad (3.47)$$

En el estado estacionario se tiene que $-\nabla \cdot \mathbf{I} = 0$. Naturalmente, al evaluar la concentración $c_{\{n, R\}}(t)$, o sus derivadas, para todos los valores de n y R , se obtendrán número reales.

Las complicaciones que surgen de la introducción de una nueva variable, como una nueva especie o un nuevo grado de libertad, en el cálculo del ritmo de nucleación no pueden resolverse completamente utilizando únicamente los esquemas propuestos inicialmente por R. Becker, W. Döring y J. Zeldovich, y aplicados en la Sección 2.4.2, para el problema homogéneo de una componente [107]. Sin embargo, dado que la dirección R no representa una especie de subunidades o bloques de construcción en el sentido convencional, es posible, al menos como paso inicial, aplicar este método a *sistemas bicomponentes*.

Usando la *condición de balance detallado*, Ec. (2.89), para eliminar los coeficientes γ en las expresiones de la corriente neta en las direcciones n y R , se obtiene que,

$$I_{n\{n, R\}} = \beta_{n\{n, R\}}(t)c_{\{n, R\}}(t) - \beta_{n\{n, R\}} \frac{c_{\{n, R\}}^{\text{eq}}}{c_{\{n+1, R\}}^{\text{eq}}} c_{\{n+1, R\}}(t) \quad (3.48)$$

y

$$I_{R\{n, R\}} = \delta R \beta_{h\{n, R\}}(t)c_{\{n, R\}}(t) - \delta R \beta_{h\{n, R\}} \frac{c_{\{n, R\}}^{\text{eq}}}{c_{\{n, R+1\}}^{\text{eq}}} c_{\{n, R+1\}}(t). \quad (3.49)$$

Para el cálculo del ritmo de AECV con energía de flexión, se emplea un tratamiento similar al de la Sección 2.4. Así, la corriente en la dirección n se puede escribir como

$$I_{n\{n, R\}} = \beta_{n\{n, R\}} c_{\{n, R\}}^{\text{eq}} \left[\frac{c_{\{n, R\}}(t)}{c_{\{n, R\}}^{\text{eq}}} - \frac{c_{\{n+1, R\}}(t)}{c_{\{n+1, R\}}^{\text{eq}}} \right]. \quad (3.50)$$

En el límite continuo, la ecuación anterior es

$$I_{n\{n, R\}} = \beta_{n\{n, R\}} c_{\{n, R\}}^{\text{eq}} \left\{ -\frac{\partial}{\partial n} \left[\frac{c_{\{n, R\}}(t)}{c_{\{n, R\}}^{\text{eq}}} \right] \right\}. \quad (3.51)$$

Ahora, implementando una generalización de la Ec. (2.45), *i.e.*,

$$c_{\{n,R\}}^{\text{eq}} = c_s \exp[-\beta \Delta G(n, R)], \quad (3.52)$$

con $\Delta G(n, R)$ dada por la Ec. (3.18), donde c_s es la concentración del solvente y una constante de normalización, se obtiene entonces que la corriente en la dirección n es

$$I_{n\{n,R\}} = \beta_{n\{n,R\}} \exp[-\beta \Delta G(n, R)] \left\{ -\frac{\partial}{\partial n} \frac{c_{\{n,R\}}(t)}{\exp[-\beta \Delta G(n, R)]} \right\}. \quad (3.53)$$

Siguiente el mismo procedimiento, se encuentra que la corriente en la dirección R tiene la siguiente forma:

$$I_{R\{n,R\}} = \beta_{R\{n,R\}} \exp[-\beta \Delta G(n, R)] \left\{ -\frac{\partial}{\partial R} \frac{c_{\{n,R\}}(t)}{\exp[-\beta \Delta G(n, R)]} \right\}, \quad (3.54)$$

siendo $\beta_{R\{n,R\}} \equiv \delta R^2 \beta_{h\{n,R\}}$.

Posteriormente, siguiendo los pasos de K. Binder y D. Stauffer [110], se invoca nuevamente al vector $\mathbf{I}$, presentado en la Ec. (3.46), con el que se describe la corriente en todas las direcciones a través de la implementación de la *matriz de crecimiento*, $\mathcal{D}$, definida como,

$$\mathcal{D} \equiv \begin{pmatrix} \beta_{n\{n,R\}} & \beta_{n,R\{n,R\}} \\ \beta_{n,R\{n,R\}} & \beta_{R\{n,R\}} \end{pmatrix}. \quad (3.55)$$

Los elementos fuera de la diagonal en la matriz anterior son cero en el AECV con energía de flexión, ya que los grados de libertad son completamente independientes.¹⁰ De esta manera, la matriz de crecimiento es

$$\mathcal{D} = \begin{pmatrix} \beta_{n\{n,R\}} & 0 \\ 0 & \beta_{R\{n,R\}} \end{pmatrix}. \quad (3.56)$$

Por lo que la corriente resulta

$$\mathbf{I} = -\mathcal{D} \exp[-\beta \Delta G(n, R)] \nabla \left\{ \frac{c_{\{n,R\}}(t)}{\exp[-\beta \Delta G(n, R)]} \right\}, \quad (3.57)$$

siendo¹¹

$$\nabla \equiv \begin{pmatrix} \frac{\partial}{\partial n} \\ \frac{\partial}{\partial R} \end{pmatrix}. \quad (3.58)$$

En esta sección, se estudia el vector de corriente neta, $\mathbf{I}$, alrededor del punto silla (n^*, R^*) .¹² Debido a esto, la Ec. (3.18) se expresa como una serie de Taylor alrededor de (n_r^*, R_r^*) . Esto es,

¹⁰Los coeficientes fuera de la diagonal en la matriz $\mathcal{D}$ podrían ser diferentes de cero si R representara una especie adicional de partículas o subunidades proteicas dentro de la solución de autoensamblaje. En la TCN de sistemas multicomponentes, la aparición de coeficientes de unión cruzados, *i.e.*, $\beta_{n,R\{n,R\}}$, resulta importante para vapores en donde la concentración de ciertos agregados supera a la concentración de las subunidades libres. En este contexto, los coeficientes cruzados desempeñan un papel crucial en los ritmos de nucleación J [78, 85, 110, 111].

¹¹El operador gradiente, ∇ , es esencialmente la matriz transpuesta del operador de divergencia, $\nabla \cdot$. Entonces, si el operador de divergencia se representa como una matriz renglón (1×2) (ver la Ec. (3.45)), el operador gradiente se representaría como una matriz columna (2×1) , que es exactamente lo que indica la Ec. (3.58).

¹²Es importante recalcar que el orden en el que se escriben las coordenadas del punto silla, ya sea como (n^*, R^*) o como (R^*, n^*) , depende únicamente de la representación del paisaje de energía o del comportamiento gráfico de la altura de la barrera energética. Por ejemplo, en las Figs. 3.4 y 3.12, el eje de las abscisas está asociado al radio instantáneo de curvatura escalado, R/R_T , mientras que el eje de las ordenadas está asignado al número instantáneo de subunidades escalado, n/n_T . De la misma manera, la dependencia de la energía libre de Gibbs (véase la Ec. (3.18)) puede indicarse como $\Delta G = \Delta G(n, R)$ o como $\Delta G = \Delta G(R, n)$ indistintamente.

$$\begin{aligned}
\Delta G(n, R) = & \Delta G^* + \left(\frac{\partial \Delta G}{\partial n} \right)_* (n - n^*) + \left(\frac{\partial \Delta G}{\partial R} \right)_* (R - R^*) \\
& + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_* (n - n^*)^2 + \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n \partial R} \right)_* (n - n^*)(R - R^*) \\
& + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right)_* (R - R^*)^2 + \dots
\end{aligned} \tag{3.59}$$

en donde el subíndice $*$ en cada una de las derivadas indica la evaluación del resultado de la operación diferencial en el tamaño crítico. Las primeras derivadas de la expresión anterior son cero, debido al significado físico de n^* y R^* , *i.e.*,

$$\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial n} \right)_* = \left(\frac{\partial \Delta G}{\partial R} \right)_* = 0. \tag{3.60}$$

Posteriormente, se define una matriz con las segundas derivadas de la energía libre evaluadas en el tamaño crítico, a saber,¹³

$$\mathbb{W}^* \equiv \begin{pmatrix} \partial_n^2 & \partial_{n,R} \\ \partial_{n,R} & \partial_R^2 \end{pmatrix}_* \Delta G(n, R), \tag{3.61}$$

junto con el vector

$$\Delta \mathbf{n} \equiv \begin{pmatrix} n - n^* \\ R - R^* \end{pmatrix}. \tag{3.62}$$

Con estas definiciones, la aproximación de $\Delta G(n, R)$ como una serie de Taylor alrededor de (R^*, n^*) , hasta segundo orden, tiene la siguiente forma:

$$\Delta G(n, R) \approx \Delta G^* + \frac{1}{2} \Delta \mathbf{n}^T \mathbb{W}^* \Delta \mathbf{n}. \tag{3.63}$$

A través de las definiciones anteriores, el vector de corriente neta de la Ec. (3.57), en las proximidades del tamaño crítico, se puede escribir como

$$\mathbf{I} = -\mathcal{D}^* \exp(-\beta \Delta G^*) \exp\left(-\frac{\beta}{2} \Delta \mathbf{n}^T \mathbb{W}^* \Delta \mathbf{n}\right) \nabla \left[\frac{c_{\{n,R\}}(t)}{\exp(-\beta \Delta G^*) \exp\left(-\frac{\beta}{2} \Delta \mathbf{n}^T \mathbb{W}^* \Delta \mathbf{n}\right)} \right]. \tag{3.64}$$

En la expresión anterior, se ha sustituido $\mathcal{D}$ por $\mathcal{D}^*$ ya que se considera que las componentes de la Ec. (3.56) cambian muy lentamente en comparación con los factores exponenciales [108]. Esto permite considerar a los coeficientes β_k también en la vecindad del tamaño crítico, a saber, β_k^* . Adicionalmente, puede observarse que los factores c_s y $\exp(-\beta \Delta G^*)$ serán constantes al elegir los parámetros físicos de la solución de autoensamblaje. Entonces, la ecuación anterior se simplifica a

¹³En la definición de la matriz $\mathbb{W}$, la notación ∂_{k^2} indica segunda derivada parcial respecto a la variable k , es decir, $\partial_{k^2} \rightarrow \partial/\partial k^2$, mientras que $\partial_{n,R}$, representa dos derivadas consecutivas, primero respecto a n y después respecto a R , *i.e.*, $\partial/\partial R \partial/\partial n$.

$$\mathbf{I} = -\mathcal{D}^* \exp\left(-\frac{\beta}{2} \Delta \mathbf{n}^T \mathbb{W}^* \Delta \mathbf{n}\right) \nabla \left[\frac{c_{\{n,R\}}(t)}{\exp\left(-\frac{\beta}{2} \Delta \mathbf{n}^T \mathbb{W}^* \Delta \mathbf{n}\right)} \right]. \quad (3.65)$$

El siguiente paso en el análisis típico de un sistema bicomponente es realizar una transformación de coordenadas para evitar resolver el problema en la presencia de $\mathcal{D}^*$, ya que, debido a la naturaleza de dicha matriz, las diferentes especies de subunidades proteicas están acopladas en el vector de corriente neta. En otras palabras, se requiere que $I_n \propto \partial_n$ y que $I_R \propto \partial_R$. El desacoplamiento de los grados de libertad, n y R , en el vector de corriente neta se realiza en la siguiente sección.

3.5.1 Desacoplamiento de los Grados de Libertad n y R

Siguiendo el proceso general propuesto por H. Reiss [107], posteriormente usado por Feder [112] [112] y H. Trinkaus [108], y más recientemente utilizado por H. Vehkamäki [78] y V. I. Kalikmanov [85], se propone hacer una transformación de las variables $\Delta \mathbf{n}$, $\mathbf{I}$ y $c_{\{n,R\}}$, a las nuevas variables

$\Delta \eta = \begin{pmatrix} m - m^* \\ r - r^* \end{pmatrix}$, $\mathcal{I} = \begin{pmatrix} I_m \\ I_r \end{pmatrix}$ y $\varrho_{\{m,r\}}$, usando las siguientes reglas:

$$\Delta \mathbf{n} \equiv \mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta, \quad \mathbf{I} \equiv \frac{\mathcal{D}^{*1/2}}{\det(\mathcal{D}^{*1/2})} \mathcal{I}, \quad c_{\{n,R\}} = \frac{\varrho_{\{m,r\}}}{\det(\mathcal{D}^{*1/2})} \quad \text{y} \quad \nabla \equiv \mathcal{D}^{*-1/2} \nabla_\eta. \quad (3.66)$$

en donde se ha incorporado $\mathcal{D}^{*1/2}$ de tal modo que $\mathcal{D}^{*1/2} \mathcal{D}^{*1/2} = \mathcal{D}^*$. Además, se considera que tanto $\mathcal{D}^*$, como $\mathcal{D}^{*1/2}$ y $\mathcal{D}^{*-1/2}$ son matrices reales y simétricas. La implementación de matrices reales y simétricas permite, en general, que el operador diferencial ∇ se transforme como [113]

$$\nabla_v = \left(\mathbb{A}^T\right)^{-1} \nabla_u, \quad \text{si} \quad v = \mathbb{A}u, \quad (3.67)$$

en donde $\mathbb{A}$ es una matriz simétrica. De acuerdo con las definiciones proporcionadas anteriormente, la Ec. (3.65) toma la siguiente forma en las nuevas coordenadas:

$$\begin{aligned} \frac{\mathcal{D}^{*1/2}}{\det(\mathcal{D}^{*1/2})} \mathcal{I} = & -\mathcal{D}^* \exp\left[-\frac{\beta}{2} \left(\mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta\right)^T \mathbb{W}^* \left(\mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta\right)\right] \times \\ & \times \mathcal{D}^{*-1/2} \nabla_\eta \left\{ \frac{\varrho_{\{m,r\}} / \det(\mathcal{D}^{*1/2})}{\exp\left[-\frac{\beta}{2} \left(\mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta\right)^T \mathbb{W}^* \left(\mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta\right)\right]} \right\}, \end{aligned} \quad (3.68)$$

una expresión que puede simplificarse a

$$\mathcal{I} = -\exp\left[-\frac{\beta}{2} \left(\mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta\right)^T \mathbb{W}^* \left(\mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta\right)\right] \nabla_\eta \left\{ \frac{\varrho_{\{m,r\}}}{\exp\left[-\frac{\beta}{2} \left(\mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta\right)^T \mathbb{W}^* \left(\mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta\right)\right]} \right\}, \quad (3.69)$$

al utilizar el hecho de que $\mathcal{D}^* \mathcal{D}^{*-1/2} = \mathcal{D}^{*1/2}$. Ahora, el factor dentro de las funciones exponenciales, que involucra la multiplicación de matrices, se puede escribir como se muestra a continuación.

$$\left(\mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta\right)^T \mathbb{1} \mathbb{W}^* \left(\mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta\right) = \left(\mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta\right)^T \left(\mathcal{D}^{*-1/2} \mathcal{D}^{*1/2}\right) \mathbb{W}^* \left(\mathcal{D}^{*1/2} \Delta \eta\right), \quad (3.70)$$

en donde se ha implementado $\mathcal{D}^{*1/2}\mathcal{D}^{*-1/2} = \mathbb{1}$, siendo $\mathbb{1}$ la *matriz identidad* (2×2). Utilizando las propiedades básicas de las matrices, y el hecho de que la matriz $\mathcal{D}^{*1/2}$ es simétrica, *i.e.*, $\mathcal{D}^{*1/2} = (\mathcal{D}^{*1/2})^T$, se puede demostrar que [114, 115]

$$(\mathcal{D}^{*1/2}\Delta\eta)^T \mathcal{D}^{*-1/2} = \Delta\eta^T (\mathcal{D}^{*1/2})^T \mathcal{D}^{*-1/2} = \Delta\eta^T \mathcal{D}^{*1/2} \mathcal{D}^{*-1/2} = \Delta\eta^T. \quad (3.71)$$

De modo que

$$(\mathcal{D}^{*1/2}\Delta\eta)^T \mathbb{W}^* (\mathcal{D}^{*1/2}\Delta\eta) = \Delta\eta^T \mathcal{D}^{*1/2} \mathbb{W}^* \mathcal{D}^{*1/2} \Delta\eta. \quad (3.72)$$

Al definir una nueva matriz simétrica $\mathbb{S}$ como

$$\mathbb{S} \equiv \mathcal{D}^{*1/2} \mathbb{W}^* \mathcal{D}^{*1/2}, \quad (3.73)$$

el vector de corriente neta en las nuevas coordenadas resulta

$$\mathcal{I} = -\exp\left(-\frac{\beta}{2}\Delta\eta^T \mathbb{S} \Delta\eta\right) \nabla_{\eta} \left[\frac{\varrho_{\{m,r\}}}{\exp\left(-\frac{\beta}{2}\Delta\eta^T \mathbb{S} \Delta\eta\right)} \right]. \quad (3.74)$$

Probablemente, la forma más directa de calcular $\Delta\eta^T \mathbb{S} \Delta\eta$ es a través de la introducción de unas nuevas coordenadas (x, y) en las que la matriz $\mathbb{S}$, Ec. (3.73), sea diagonal. Este proceso tiene múltiples ventajas para el producto matricial y a continuación se enuncian las tres principales: (i) La transformación hacia las nuevas coordenadas (x, y) puede ser interpretada como una rotación que actúa sobre los ejes coordenados originales hacia la dirección de los *eigenvectores* de $\mathbb{S}$, a saber, $\mathbf{e}_{\lambda_1}$ y $\mathbf{e}_{\lambda_2}$, (lo que a su vez permite el cálculo del flujo en una dirección efectiva [78, 85] y desacoplar los grados de libertad de autoensamblaje). (ii) Debido a que $\mathbb{S}$ es simétrica naturalmente (y permanecerá simétrica en la rotación), los elementos de su diagonal son los *eigenvalores* del problema $\mathbb{S}\mathbf{e}_{\lambda_i} = \lambda_i \mathbf{e}_{\lambda_i}$, mientras que sus *eigenvectores* son ortogonales y, por lo tanto, forman una base ortogonal en el espacio vectorial [116]. (iii) Finalmente, la diagonalización de una matriz (o tener una matriz diagonal en un nuevo sistema de coordenadas) simplifica muchas operaciones, *e.g.*, el cálculo de determinantes y potencias de una matriz, así como la solución de sistemas lineales [114, 115]. Considerando estos argumentos, la transformación de coordenadas puede representarse con una matriz ortogonal $\mathbb{Q}$,¹⁴ de manera que los vectores, matrices y operadores $\Delta\eta$, $\mathcal{I}$, $\mathbb{S}$ y ∇_{η} , en las nuevas coordenadas son:

$$\Delta\eta' = \mathbb{Q} \Delta\eta, \quad \mathcal{I}' = \mathbb{Q} \mathcal{I}, \quad \mathbb{S}' = \mathbb{Q} \cdot \mathbb{S} \cdot \mathbb{Q}^{-1}, \quad \text{y} \quad \nabla_{\eta'} = \mathbb{Q} \nabla_{\eta}, \quad (3.76)$$

respectivamente. Siguiendo este razonamiento, se puede asegurar que

$$\mathbb{S}' = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{pmatrix}, \quad (3.77)$$

¹⁴La matriz de rotación típicamente utilizada para realizar una rotación en el espacio Euclidiano es

$$\mathbb{Q} = \begin{pmatrix} \cos \vartheta & -\sin \vartheta \\ \sin \vartheta & \cos \vartheta \end{pmatrix}. \quad (3.75)$$

La matriz $\mathbb{Q}$ rota todos los puntos en el plano definido por las variables originales en sentido contrario a las manecillas del reloj, un ángulo ϑ alrededor del origen del espacio bidimensional. [114, 116]. Dentro del contexto de AECV, ϑ denota el ángulo del flujo de tamaño crítico en el sistema de coordenadas (n, R) .

y, por lo tanto, que la Ec. (3.74) se transforma resultando en¹⁵

$$\mathcal{I}' = -\exp\left[-\frac{\beta}{2}(\Delta\eta_1'^2\lambda_1 + \Delta\eta_2'^2\lambda_2)\right] \nabla\eta' \left\{ \varrho_{\{m,r\}} \exp\left[\frac{\beta}{2}(\Delta\eta_1'^2\lambda_1 + \Delta\eta_2'^2\lambda_2)\right] \right\}, \quad (3.79)$$

en donde $\Delta\eta_1'$ y $\Delta\eta_2'$ representan la primera y segunda componente del vector $\Delta\eta'$. La ecuación anterior indica que $\mathcal{I}'_1$ y $\mathcal{I}'_2$ han sido completamente desacopladas. En otras palabras, las componentes de la corriente neta son

$$\begin{aligned} \mathcal{I}'_1 &= -\exp\left[-\frac{\beta}{2}(\Delta\eta_1'^2\lambda_1 + \Delta\eta_2'^2\lambda_2)\right] \frac{\partial}{\partial\Delta\eta_1'} \left\{ \varrho_{\{m,r\}} \exp\left[\frac{\beta}{2}(\Delta\eta_1'^2\lambda_1 + \Delta\eta_2'^2\lambda_2)\right] \right\}, \\ &= -\exp\left(-\frac{\beta}{2}\Delta\eta_1'^2\lambda_1\right) \frac{\partial}{\partial\Delta\eta_1'} \left[\varrho_{\{m,r\}} \exp\left(\frac{\beta}{2}\Delta\eta_1'^2\lambda_1\right) \right], \end{aligned} \quad (3.80)$$

y

$$\mathcal{I}'_2 = -\exp\left(-\frac{\beta}{2}\Delta\eta_2'^2\lambda_2\right) \frac{\partial}{\partial\Delta\eta_2'} \left[\varrho_{\{m,r\}} \exp\left(\frac{\beta}{2}\Delta\eta_2'^2\lambda_2\right) \right]. \quad (3.81)$$

Para continuar con el cálculo, se asume que, alrededor del punto crítico, la dirección del flujo es constante. Dicho de otra manera, se supone que solamente la región del tamaño crítico contribuye a las integrales que se requieren para calcular $\mathbf{J}$. Debido a que, en las nuevas coordenadas (x, y) , el eje x es paralelo al flujo del tamaño crítico, entonces el vector de la corriente neta es

$$\mathcal{I}_{x,y} = \begin{pmatrix} I_x \\ 0 \end{pmatrix}, \quad (3.82)$$

con $x \rightarrow \Delta\eta_1'$ y $y \rightarrow \Delta\eta_2'$. En el estado estacionario, la divergencia de la corriente en estas coordenadas se escribe como

$$\nabla_{x,y} \cdot \mathcal{I}_{x,y} = \frac{\partial I_x}{\partial x} + \frac{\partial 0}{\partial y} = 0, \quad (3.83)$$

una expresión que indica que I_x depende únicamente de y , *i.e.*, $I_x = I_x(y)$. Este resultado permite poder integrar la corriente en la dirección x y resolver como en el caso de una componente (véase la Sección 2.4.3). Posteriormente, se puede integrar $I_x(y)$ respecto a y sobre todo el dominio para obtener el flujo total que pasa a través de la región crítica.¹⁶ Los argumentos anteriores introducen ciertas restricciones sobre las Ecs. (3.80) y (3.81). Particularmente, a partir de la Ec. (3.81) se obtiene que, alrededor del punto crítico,

$$\frac{\partial}{\partial\Delta\eta_2'} \left\{ \varrho_{\{m,r\}} \exp\left[\frac{\beta}{2}(\Delta\eta_1'^2\lambda_1 + \Delta\eta_2'^2\lambda_2)\right] \right\} = 0. \quad (3.84)$$

¹⁵Para obtener la Ec. (3.77), se utilizó el siguiente resultado:

$$(\Delta\eta')^T \mathbb{S}' \Delta\eta' = (\Delta\eta_1', \Delta\eta_2') \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \Delta\eta_1' \\ \Delta\eta_2' \end{pmatrix} = \Delta\eta_1'^2\lambda_1 + \Delta\eta_2'^2\lambda_2. \quad (3.78)$$

¹⁶Anteriormente, H. Reiss usó argumentos cinéticos y termodinámicos para mostrar que el ritmo de nucleación del problema binario pasa a través del punto silla en el espacio de la formación de la nueva fase [107].

3.5.2 Ritmo de Nucleación J en el Estado Estacionario

En el estado estacionario, la corriente en la dirección $x = \Delta\eta'_1$ es independiente de x (ver Ec. (3.83)). Por lo tanto, la Ec. (3.80) se puede reorganizar como

$$\frac{\mathcal{I}_1}{\exp\left(-\frac{\beta}{2}\Delta\eta'^2_1\lambda_1\right)} = -\frac{\partial}{\partial\Delta\eta'_1}\left[\varrho_{\{m,r\}}\exp\left(\frac{\beta}{2}\Delta\eta'^2_1\lambda_1\right)\right]. \quad (3.85)$$

De la misma manera que en el caso clásico, las funciones exponenciales de la ecuación anterior son dominantes en las proximidades del tamaño crítico. Por lo que, en una integral sobre todo el dominio de las nuevas variables (x, y) , únicamente la región del punto crítico contribuye significativamente a la suma total de contribuciones. Esto permite que al integrar respecto a $\Delta\eta'_1$, los límites puedan extenderse al dominio $(-\infty, \infty)$. Integrando la ecuación anterior, se obtiene, usando el teorema fundamental del cálculo, que¹⁷

$$\mathcal{I}'_1 \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left(-\frac{\beta}{2}\Delta\eta'^2_1|\lambda_1|\right) d\Delta\eta'_1 = \left[-\varrho_{\{m,r\}}\exp\left(\frac{\beta}{2}\Delta\eta'^2_1\lambda_1\right)\right]\Big|_{-\infty}^{\infty}. \quad (3.88)$$

El lado izquierdo de la ecuación anterior es una integral Gaussiana que se integra fácilmente usando la Ec. (2.111), *i.e.*,

$$\int_{-\infty}^{\infty} e^{-ax^2} dx = \sqrt{\frac{\pi}{a}}, \quad \text{para } a > 0, \quad (2.111)$$

Así, el resultado de dicha integral es

$$\int_{-\infty}^{\infty} \exp\left(-\frac{\beta}{2}\Delta\eta'^2_1|\lambda_1|\right) d\Delta\eta'_1 = \sqrt{\frac{2\pi}{\beta|\lambda_1|}}. \quad (3.89)$$

Antes de evaluar el lado derecho de la Ec. (3.88), se lleva a cabo la multiplicación y división por el producto $c_s \exp\left(\frac{\beta}{2}\Delta\eta'^2_2\right) \exp(\beta\Delta G^*)$, a la vez que se utiliza la relación entre $c_{\{n,R\}}$ y $\varrho_{\{m,r\}}$ de la Ec. (3.66), por lo que después de un poco de álgebra, se obtiene¹⁸

¹⁷ Usando las propiedades básicas del determinante de un producto de matrices, $\det(\mathbb{A}\mathbb{B}) = \det(\mathbb{A})\det(\mathbb{B})$, junto con la tercera igualdad de la Ec. (3.76), se observa que

$$\det \mathbb{S}' = \det (\mathbb{Q} \cdot \mathbb{S} \cdot \mathbb{Q}^{-1}) = \mathbb{1} \cdot \det (\mathbb{S}) \cdot \mathbb{1} = \det (\mathbb{S}), \quad (3.86)$$

en donde se emplearon las propiedades de ortogonalidad de la matriz $\mathbb{Q}$, *i.e.*, $\det (\mathbb{Q}) = \mathbb{1}$, además del determinante del inverso de una matriz, es decir, $\det (\mathbb{A}^{-1}) = [\det (\mathbb{A})]^{-1}$. Después, al implementar la Ec. (3.73), y generalizando la propiedad del determinante del producto de matrices como $\det (\mathbb{A}^n) = \det (\mathbb{A} \cdot \mathbb{A} \cdot \mathbb{A} \cdots \mathbb{A}) = \det [(\mathbb{A})]^n$, la ecuación anterior se escribe como se muestra a continuación:

$$\det (\mathbb{S}') = \det (\mathcal{D}^*)^{1/2} \det (\mathbb{W}^*) \det (\mathcal{D}^*)^{1/2} = \det (\mathbb{W}^*) \det (\mathcal{D}^*). \quad (3.87)$$

Por un lado, el determinante de la matriz de crecimiento, Ec. (3.55), es positivo. Por otro lado, dado que el punto crítico es un punto silla, el determinante de $\mathbb{W}^*$, Ec. (3.61), es negativo. Así, se concluye que $\det (\mathbb{S}') = \det (\mathbb{S}) < 0$. Además, puesto que $\det (\mathbb{S}) = \lambda_1\lambda_2$, este resultado implica que uno de los eigenvalores debe ser negativo. Típicamente, se elige a λ_1 como el eigenvalor negativo [78, 107], por lo que dicha cantidad se escribe como $\lambda_1 = -|\lambda_1|$ en la Ec. (3.88) para enfatizar que el valor propio es negativo.

¹⁸ Para ver este cálculo más directamente, y sobre todo la inclusión de $\exp(\beta\Delta G)$, hay que notar que, según la Ec. (3.63), «nota al pie continua en la siguiente página»

$$\begin{aligned}
\mathcal{I}'_1 \sqrt{\frac{2\pi}{\beta|\lambda_1|}} &= \left\{ -\frac{c_{\{n,R\}} \det(R^{*1/2}) c_s \exp\left[\frac{\beta}{2}(\Delta\eta_1'^2 \lambda_1 + \Delta\eta_2'^2 \lambda_2)\right] \exp(\beta\Delta G^*)}{c_s \exp\left(\frac{\beta}{2}\Delta\eta_2'^2 \lambda_2\right) \exp(\beta\Delta G^*)} \right\} \Big|_{-\infty}^{\infty} \\
&= -\det(\mathcal{D}^{*1/2}) c_s \exp\left(-\frac{\beta}{2}\Delta\eta_2'^2 \lambda_2\right) \exp(-\beta\Delta G^*) \left[\frac{c_{\{n,R\}}}{c_s \exp(-\beta\Delta G)} \right] \Big|_{-\infty}^{\infty},
\end{aligned} \tag{3.91}$$

En el estado estacionario, las condiciones a la frontera que se requieren para tener una corriente y un flujo finito son idénticas a las del sistema en una dimensión, *i.e.*, una concentración de subunidades fija en el equilibrio y una concentración despreciable de cápsides completamente formadas. Matemáticamente, estas condiciones, en las variables primadas, son $c_{\{n,R\}}/[c_s \exp(-\beta\Delta G)] \rightarrow 1$ para $\Delta\eta_1' \rightarrow -\infty$ y $c_{\{n,R\}}/[c_s \exp(-\beta\Delta G)] \rightarrow 0$ para $\Delta\eta_1' \rightarrow +\infty$. De esta manera, la ecuación anterior puede expresarse de forma alternativa como

$$\mathcal{I}'_1 = \sqrt{\frac{\beta|\lambda_1|}{2\pi}} \det(\mathcal{D}^{*1/2}) c_s \exp(-\beta\Delta G^*) \exp\left(-\frac{\beta}{2}\Delta\eta_2'^2 \lambda_2\right). \tag{3.92}$$

Con el objetivo de considerar todas las contribuciones de la corriente sobre todo del dominio de $\Delta\eta_2'$ y calcular el ritmo de nucleación J , se integra la ecuación anterior respecto a $\Delta\eta_2'$ en $(-\infty, \infty)$, a saber,

$$J = \int_{-\infty}^{\infty} \mathcal{I}'_1 d\Delta\eta_2' = \sqrt{\frac{\beta|\lambda_1|}{2\pi}} \det(\mathcal{D}^{*1/2}) c_s \exp(-\beta\Delta G^*) \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left(-\frac{\beta}{2}\Delta\eta_2'^2 \lambda_2\right) d\Delta\eta_2', \tag{3.93}$$

una ecuación que, usando nuevamente la Ec. (2.111), finalmente conduce a

$$J = \frac{\beta|\lambda_1|}{2\pi} \frac{\det(\mathcal{D}^{*1/2}) c_s \exp(-\beta\Delta G^*)}{\sqrt{\frac{\beta^2|\lambda_1|\lambda_2}{4\pi^2}}}. \tag{3.94}$$

Por un lado, notando que

$$|\det(\mathbb{S})| = |\lambda_1|\lambda_2, \tag{3.95}$$

y haciendo uso de las Ecs. (3.86) y (3.87), se concluye que

$$|\lambda_1|\lambda_2 = |\det(\mathcal{D}^*)| |\det(\mathbb{W}^*)|. \tag{3.96}$$

Por otro lado, el factor $\beta^2/4\pi^2$ puede ser incluido en el determinante $\det(\mathbb{W}^*)$ (véase la Ec. (3.61)) como sigue:

«continua nota al pie de la página anterior»

$$\begin{aligned}
\exp(\beta\Delta G) &\approx \exp\left(\beta\Delta G^* + \frac{\beta}{2}\Delta\eta^T \mathbb{W}^* \Delta\eta\right) = \exp\left[\beta\Delta G + \frac{\beta}{2}(\Delta\eta^T \mathcal{D}^{*1/2} \mathbb{W}^* \mathcal{D}^{*1/2} \Delta\eta)\right] \\
&= \exp\left[\beta\Delta G^* + \frac{\beta}{2}(\Delta\eta^T \mathbb{S} \Delta\eta)\right] \\
&= \exp\left[\beta\Delta G^* + \frac{\beta}{2}(\Delta\eta_1'^2 \lambda_1 + \Delta\eta_2'^2 \lambda_2)\right].
\end{aligned} \tag{3.90}$$

$$\det\left(\frac{\mathbb{W}^*\beta}{2\pi}\right) = \det(\mathbb{W}^*)\frac{\beta^2}{4\pi^2}. \quad (3.97)$$

De acuerdo con estas dos últimas ecuaciones, el ritmo de nucleación de la Ec. (3.94) se puede escribir como

$$J = \frac{\beta|\lambda_1|}{2\pi}c_s \exp(-\beta\Delta G^*) \frac{1}{\sqrt{|\det(\frac{\beta}{2\pi}\mathbb{W}^*)|}}. \quad (3.98)$$

La ecuación (3.98) es la expresión del ritmo de nucleación de un sistema multicomponente [78, 85, 107, 108, 110, 111]. Como señalaron H. Vehkamäki, V. I. Kalikmanov, y otros investigadores, la expresión general para la tasa de nucleación, J , de un sistema de múltiples dimensiones, Ec. (3.98), y por lo tanto de un sistema bicomponente, no se reduce al caso de un sistema unidimensional, Ec. (2.113). Principalmente porque las matrices involucradas en el cálculo del ritmo de nucleación tienen determinante cero si el número de una de las especies involucradas es cero.

Adicionalmente, se puede demostrar que, usando conjuntamente las relaciones de las Ecs. (3.66) y (3.76), y después de un poco de álgebra matricial, el problema de eigenvalores asociado a λ_1 está dado por

$$\mathcal{D}^*\mathbb{W}^*\mathbb{1} = \lambda_1\mathbb{1}, \quad (3.99)$$

lo que significa que la dirección de la corriente neta es la del eigenvalor negativo del producto matricial $\mathcal{D}^*\mathbb{W}^*$, aún en las coordenadas originales (n, R) .

En el caso de un sistema de dos grados de libertad independientes, la Ec. (3.98), se simplifica a la siguiente expresión:

$$J = \frac{|\lambda_1|c_s \exp(-\beta\Delta G^*)}{\sqrt{|\det(\mathbb{W}^*)|}}. \quad (3.100)$$

El producto matricial $\mathcal{D}^*\mathbb{W}^*$ (ver Ecs. (3.56) y (3.61)) da como resultado

$$\mathcal{D}^*\mathbb{W}^* = \begin{pmatrix} \beta_n^* \left\{ \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right\}_* & \beta_n^* \left\{ \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n \partial R} \right\}_* \\ \beta_R^* \left\{ \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n \partial R} \right\}_* & \beta_R^* \left\{ \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right\}_* \end{pmatrix}, \quad (3.101)$$

Además, el eigenvalor de este producto de matrices que satisface que es negativo para todos los valores de Γ y $\tilde{f}_r$ es

$$\lambda_1 = \frac{1}{2} \left\{ \beta_n^* \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_* + \beta_R^* \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right)_* - \left[\beta_n^{*2} \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_*^2 + \beta_R^{*2} \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right)_*^2 + 4\beta_n^* \beta_R^* \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n \partial R} \right)_*^2 - 2\beta_n^* \beta_R^* \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_* \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right)_* \right]^{1/2} \right\}. \quad (3.102)$$

en donde se ha hecho $\beta_{n\{n,R\}}^* \rightarrow \beta_n^*$ y $\beta_{R\{n,R\}}^* \rightarrow \beta_R^*$ por simplicidad. Al factorizar β_n^* de la expresión anterior, se obtiene

$$\lambda_1 = \frac{\beta_n^*}{2} \left\{ \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_* + \frac{\beta_R^*}{\beta_n^*} \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right)_* + \right. \\ \left. - \left[\left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_*^2 + \left(\frac{\beta_R^*}{\beta_n^*} \right)^2 \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right)_*^2 + \frac{4\beta_R^*}{\beta_n^*} \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n \partial R} \right)_*^2 - \frac{2\beta_R^*}{\beta_n^*} \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_* \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right)_* \right]^{1/2} \right\}. \quad (3.103)$$

Por otro lado, el determinante de $\mathbb{W}^*$ es

$$\det(\mathbb{W}^*) = \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_* \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right)_* - \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n \partial R} \right)_*^2 < 0. \quad (3.104)$$

Considere el caso en el que $\beta_R^* \gg \beta_n^*$: En este caso, el ritmo de cambio en el radio de curvatura de una cápside parcial es mucho más grande que el ritmo de asociación de subunidades proteicas en agregados intermediarios. Físicamente, este escenario refleja el hecho, tal como se describió en la Sección 3.3, que el radio de curvatura de una cápside que se forma con energía de flexión se comprime en la trayectoria de compresión al perder el confinamiento en R , mientras el cociente n_c/n_T se mantiene constante. Por lo tanto, considerar que $\beta_R^* \gg \beta_n^*$ es razonable. Bajo esta suposición, el eigenvalor λ_1 se simplifica a ¹⁹

$$\lambda_{1 \beta_R^* \gg \beta_n^*} \approx \beta_n^* \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_*. \quad (3.107)$$

En este caso, usando las Ecs. (3.100), (3.104) y (3.107) el ritmo de nucleación en el estado estacionario es

$$J_{\beta_R^* \gg \beta_n^*} \equiv c_s \beta_n^* \left| \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right|_* \exp(-\beta \Delta G^*) \left| \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_* \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right)_* - \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n \partial R} \right)_*^2 \right|_*^{-1/2}. \quad (3.108)$$

¹⁹Para ver esto más claramente considere primero el producto $\mathcal{D}^{*-1} \mathbb{W}^{-1}$ de forma análoga a la técnica de D. Stauffer [109], *i.e.*,

$$\mathcal{D}^{*-1} \mathbb{W}^{-1} = \frac{1}{\det(\mathbb{W})} \begin{pmatrix} \beta_n^{*-1} & 0 \\ 0 & \beta_R^{*-1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right)_* & -\left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n \partial R} \right)_* \\ -\left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n \partial R} \right)_* & \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_* \end{pmatrix}. \quad (3.105)$$

En el límite cuando $\beta_R^* \gg \beta_n^*$, los eigenvalores de la matriz anterior son

$$\lambda_{1 \beta_R^* \gg \beta_n^*}^{-1} \approx \beta_n^* \left[\left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_* - \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n \partial R} \right)_* / \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right)_* \right] \quad \text{y} \quad \lambda_{2 \beta_R^* \gg \beta_n^*}^{-1} \approx 0. \quad (3.106)$$

En este contexto, los eigenvalores λ_i del producto matricial $\mathcal{D}^* \mathbb{W}^*$ se pueden calcular rápidamente teniendo en cuenta la Ec. (3.96) y el hecho de que en el caso en cuestión $\det(\mathcal{D}^*) \approx 0$, entonces $\lambda_{2 \beta_R^* \gg \beta_n^*} \approx 0$, debido a que $\lambda_{1 \beta_R^* \gg \beta_n^*}$ debe ser estrictamente negativo (ver pie de página en la página 71). De esta manera, y considerando que $(\partial^2 \Delta G n / \partial n \partial R)_*^2 \ll (\partial^2 \Delta G / \partial^2 R)_*$, debido a que la curvatura es muy pronunciada en la dirección R , puede concluirse que

$$\lambda_{1 \beta_R^* \gg \beta_n^*} \approx \beta_n^* \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_*. \quad (3.107)$$

En la Figura 3.16 (panel izquierdo), se presentan las gráficas de $J_{\beta_R^* \gg \beta_n^*} / c_s \beta_n^*$ en función de la supersaturación, Γ , para diferentes valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$. En ese mismo gráfico, la línea negra discontinua describe el ritmo de nucleación en el estado estacionario del modelo clásico, *i.e.*, el AECV sin energía de flexión (ver Sección 2.4.3 y Ec. (2.113)).

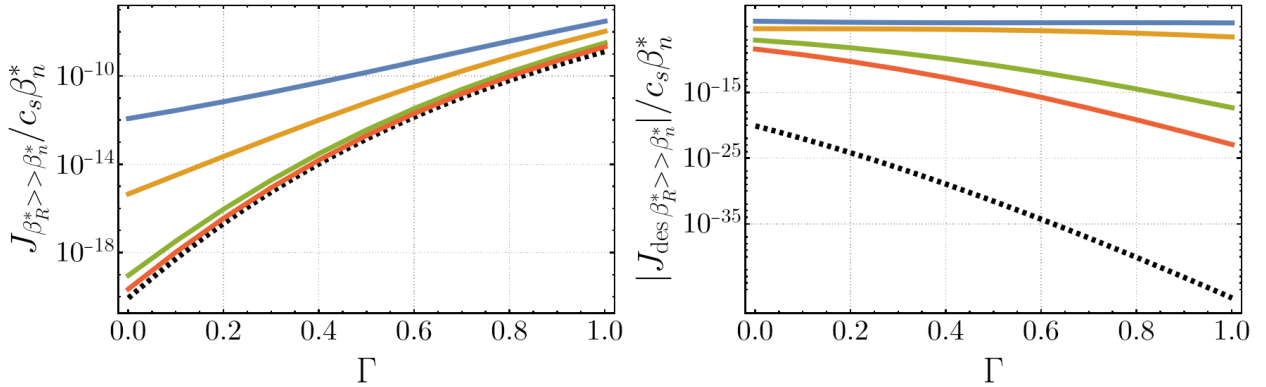


Figura 3.16: Curvas representativas del ritmo de nucleación de autoensamblaje (panel izquierdo), $J_{\beta_R^* \gg \beta_n^*} / c_s \beta_n^*$, y desensamblaje (panel derecho), $|J_{des \beta_R^* \gg \beta_n^*}| / c_s \beta_n^*$, en el estado estacionario como función de la supersaturación Γ para diferentes valores de la constante de flexión $\tilde{f}_r$. Para generar los dos gráficos se utilizó $n_T = 120$, $R_T = 10$ nm $\Delta g \approx -5.0 k_B T$ y un conjunto de valores de $\tilde{f}_r$: $\tilde{f}_r = 0.50$ (línea azul), $\tilde{f}_r = 1.00$ (línea naranja), $\tilde{f}_r = 5.00$ (línea verde) y $\tilde{f}_r = 10.00$ (línea roja). La línea negra discontinua describe el comportamiento del ritmo de nucleación en el modelo clásico (ver Ec. (2.118) para autoensamblaje y Ec. (2.125) para desensamblaje).

Tal como se anticipó en las Secciones 3.3 y 3.4, las cápsides virales se autoensamblan a tamaños subóptimos para cualquier valor de $\tilde{f}_r$ y $\Gamma > 0$. Se puede ver que el ritmo de autoensamblaje J , Ec. (3.108), es más grande que en comparación con el resultado sin energía de flexión, denominado $J_{clásico}$, *i.e.*,

$$J_{clásico} \equiv c_s \beta_n^* Z_0 (\Gamma^2 + 1)^{3/4} \exp \left[-\beta \Delta G_0^* (\sqrt{\Gamma^2 + 1} - \Gamma) \right], \quad (2.118)$$

siendo $Z_0 \equiv \sqrt{\beta \lambda / \pi n_T}$. Esta afirmación puede deducirse directamente del comportamiento de la barrera de energía y su tendencia al caso clásico para $\tilde{f}_r \rightarrow \infty$. La razón principal es que precisamente la altura de la barrera de energía (cuando ésta es lo suficientemente grande) es el elemento que controla la cinética de autoensamblaje. Dicho de otra forma, si en general se puede ver que $J \sim \exp(-\beta \Delta G^*)$, entonces el sistema que tenga la menor barrera energética, ensamblará sus núcleos de cápside más rápidamente. Así, los factores que multiplican a esta exponencial (como el factor de Zeldovich en el caso de las Ecs. (2.118) y (2.125)) servirán de correcciones finas del ritmo de nucleación.²⁰

²⁰A lo largo del Capítulo 3, particularmente a partir de la Sección 3.2.4, se han utilizado las variables adimensionales n_r y R_r para estudiar el AECV con energía de flexión. Por ejemplo, en vez de emplear la energía libre de Gibbs de autoensamblaje como se muestra en la Ec. (3.18), se introduce el concepto de la energía libre escalada, Ec. (3.21), y a partir de este punto, se utilizan los parámetros de supersaturación y constante de flexión como se muestra en las Ecs. (3.20). En contraste, en todo el Capítulo 2 el tratamiento es directo, ya que la presencia de solamente un grado de libertad permite una manipulación relativamente sencilla de las expresiones que modelan el fenómeno de autoensamblaje. En este sentido, utilizar las propiedades físicas del sistema en su forma escalada es conveniente en ciertas ocasiones, como en el caso del análisis de la altura de la barrera de energía, e inconveniente en otras, como al estudiar el ritmo de autoensamblaje. Este último caso, podría suceder que, en la versión adimensional de J , los factores que multiplican a la exponencial $\exp(-\Delta \mathcal{E}^*)$ adquieran un escalamiento tan grande que la presencia de la altura de la barrera de energía sea despreciable, lo que a su vez daría una interpretación incorrecta de J .

Una vez que se han ensamblado estos núcleos, estos agregados intermediarios de tamaño crítico crecen añadiendo subunidades proteicas a la vez que comprimen su radio de curvatura hasta alcanzar los valores n_c y R_c . Por otro lado, para valores muy grandes de $\tilde{f}_r$, se espera que el agregado en formación mantenga la curvatura preferencial y se recupere el ritmo de nucleación del AECV sin energía de flexión. En otras palabras, si la constante de flexión es muy grande, la cantidad de energía requerida para desviar a la cápside de su curvatura preferencial también lo es. Esto implica que el tamaño del núcleo crítico será aquel del modelo del Capítulo 2 y éstos se autoensamblarán tan rápido como en el caso sin energía de flexión, *i.e.*, $J_{\beta_R^* \gg \beta_n^*} \approx J_{\text{clásico}}$.

3.6 Desensamblaje de Cápsides Virales

De manera similar a lo establecido en la Sección 2.5, el desensamblaje de cápsides virales tendiendo en cuenta la energía de flexión ocurre en condiciones ambientales diferentes a las del autoensamblaje, exhibiendo el fenómeno de histéresis. Este mecanismo puede modelarse siguiendo un procedimiento análogo al del capítulo anterior.

La ecuación maestra de un sistema bicomponente, presentada en la Ec. (3.39), también puede describir el desensamblaje de cápsides cerradas con las condiciones a la frontera adecuadas, es decir, aquellas en donde la concentración de cápsides virales es mucho mayor que la concentración de subunidades proteicas libres. Adicionalmente, hay que considerar que la disociación de cápsides virales requiere saltar la barrera de energía en el sentido opuesto al autoensamblaje, *i.e.*, de derecha a izquierda. La altura de la barrera de energía de desensamblaje es (véase la Ec. (2.121))

$$\Delta G_{\text{des}}^* = \Delta G^* - \Delta G(n_r = n_{rc}, R_r = R_{rc}), \quad (3.109)$$

siendo ΔG^* la altura de la barrera de energía y $\Delta G(n_{rc}, R_{rc})$ la energía libre evaluada en los valores críticos de cierre n_c y R_c , los cuáles se pueden obtener mediante las Ecs. (3.24) y (3.25). Por las mismas razones expuestas en la Sección 2.5.1, el desensamblaje requiere de condiciones de subsaturación, por lo que $\Gamma < 0$. Por su parte, las condiciones a la frontera de desensamblaje son las inversas a las utilizadas en la integración de la Ec. (3.85) y evaluación de la Ec. (3.88), a saber, $c_{\{n,R\}}/[c_s \exp(-\beta \Delta G)] \rightarrow 0$ y $c_{\{n,R\}}/[c_s \exp(-\beta \Delta G)] \rightarrow 1$ para $\Delta \eta_1 \rightarrow -\infty$ y $\Delta \eta_1 \rightarrow +\infty$, respectivamente. Esto implica que la Ec. (3.92) se modifique a la siguiente:

$$\mathcal{I}'_1 = -\sqrt{\frac{\beta|\lambda_1|}{2\pi}} \det(\mathcal{D}^{*1/2}) c_s \exp(-\beta \Delta G_{\text{des}}^*) \exp\left(-\frac{\beta}{2} \Delta \eta_2'^2 \lambda_2\right). \quad (3.110)$$

El signo menos en la ecuación anterior refleja la disolución de cápsides virales. Los demás elementos de dicha ecuación son idénticos a los de la Sección 3.5, es decir, $\mathcal{D}^*$, $\mathbb{W}^*$ y λ_1 están dados por las Ecs. (3.55), (3.61) y (3.103), respectivamente.

El proceso para calcular la tasa de nucleación de desensamblaje en el estado estacionario, J_{des} , a partir de la Ec. (3.110), es el mismo que el que se sigue de la Ec. (3.92) a la Ec. (3.100). Por lo tanto, el ritmo de desensamblaje resulta en

$$J_{\text{des}} = -\frac{|\lambda_1| c_s \exp(-\beta \Delta G_{\text{des}}^*)}{\sqrt{|\det(\mathbb{W}^*)|}}. \quad (3.111)$$

o, de forma explícita,

$$J_{\text{des } \beta_R^* \gg \beta_n^*} \equiv -c_s \beta_n^* \left| \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right|_* \exp(-\beta \Delta G_{\text{des}}^*) \left| \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n^2} \right)_* \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial R^2} \right)_* - \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial n \partial R} \right)_*^2 \right|^{-1/2}. \quad (3.112)$$

Las conclusiones obtenidas para la tasa de nucleación de autoensamblaje pueden transmitirse directamente a la solución del ritmo de desensamblaje. Las cápsides con tamaños menores a los del modelo clásico se disolverán también más rápidamente, en general, que las que crecieron a partir de un núcleo con las subunidades y el radio de curvatura preferencial.

3.7 Estimaciones para Cápsides Virales Reales

3.7.1 Propiedades Geométricas y Mecánicas

En esta sección, se presentan las características geométricas y mecánicas relevantes de algunas cápsides virales para obtener estimaciones cuantitativas del ritmo de nucleación. Adicionalmente, se analiza el comportamiento energético y cinético del Virus de Simio 40 (VS40) durante su proceso de autoensamblaje.

Utilizando la estimación del módulo de flexión que se deriva en la Sección 3.9 (en donde además se presenta una visión breve e integral del estudio de las propiedades mecánicas de los virus mediante nanoindentación), es posible obtener una aproximación del valor numérico de κ para una amplia variedad de virus. En el Tabla 3.1, se muestran los valores del módulo de flexión estimados con la Ec. (3.117) para diferentes cápsides virales esféricas vacías.²¹ Los valores estimados del módulo de flexión para cápsides virales oscilan entre $10 k_B T$ a $200 k_B T$, pero típicamente se encuentran en el extremo superior del rango, *i.e.*, entre $100 k_B T$ y $200 k_B T$ [36].

Tabla 4.1 Propiedades geométricas y mecánicas de cápsides virales				
Virus	Radio (nm)	Espesor h (nm)	Módulo de Young E (GPa)	Módulo de flexión κ ($\mathbf{k_B T}$)
VHB [†]	13.6 [84]	2.1	0.26 [118]	59.02
VMCC	11.8 [119]	2.8	0.28 [119]	150.67
VDR	11.5 [120]	2.0	1.25 [120]	245.14
VS40	22.5 [121]	6.0 [121]	0.033* [43]	174.73
VLM [‡]	50.0	4.0	0.23	360.85
IVW	70.0 [122]	4.0 [122]	2.79 [117]	4,377.24

Tabla 3.1: Propiedades geométricas y mecánicas de las cápsides del Virus de la Hepatitis B (VHB)[†], Virus del Moteado Clorótico del Caupí (VMCC), Virus Diminuto de Ratón (VDR), VS40, Virus de Leucemia Murina (VLM)[‡] e Iridovirus de Wiseana (IVW). El espesor de las cápsides que no están referenciadas se extrajo de [25], mientras que el módulo de flexión, κ , se calculó usando la Ec. (3.117), con $\nu_p = 0.4$ y $T = 20^\circ C$.

[†]La cápside del VHB exhibe estructuras $T_r = 3$ y $T_r = 4$, compuestas de 90 y 120 dímeros, respectivamente [63]. En esta tabla se presentan únicamente los resultados relacionados con la cápside $T_r = 4$ del VHB.

*El módulo de Young, E , asociado al VS40 fue estimado por C. Mendoza y D. Reguera [43] usando la constante de resorte experimental medida con el Microscopio de Fuerza Atómica (MFA) [121] mediante la ecuación $k_{\text{resorte}} = 2.25 E h^2 / R$, que proviene de la TCD [102].

[‡]Los valores para el VLM fueron obtenidos mediante experimentos realizados en partículas virales inmaduras (cápside con material genético dentro), no en cápsides vacías [123].

²¹El módulo de Young, E , de las cápsides fue obtenido mediante técnicas experimentales de indentación, excepto para el IVW, que fue calculado con *dispersión de luz brillante* [117].

En este contexto, es posible obtener una estimación adecuada para Γ y $\tilde{f}_r$ en términos de los parámetros físicos del modelo clásico, *i.e.*, Δg , $\Delta\mu$ (ver Secciones 2.2 y 2.3), y ahora el nuevo parámetro κ . Utilizando las Ecs. (2.64), (2.66), (3.20) y (3.117), es fácil ver que

$$\Gamma = \frac{2\Delta\mu\sqrt{n_T}}{\pi\Delta g} \quad \text{y} \quad \tilde{f}_r = -\frac{4\kappa}{\Delta g\sqrt{n_T}}, \quad (3.113)$$

por lo que los parámetros principales que determinan el autoensamblaje dependen de: (i) la diferencia de potencial químico entre los distintos estados del sistema (libre o agregado), la cual está relacionada con la concentración de subunidades libres en la solución (ver Ecs. (2.52) y (2.53)); (ii) la energía de enlace efectiva por subunidad, Δg ; y (iii) la rigidez de la cápside, vinculada con κ .

A continuación, se particulariza la teoría desarrollada en este capítulo para el caso del autoensamblaje del VS40.

3.7.2 Aspectos Físicos del Autoensamblaje de la Cápside del VS40

El Virus de Simio 40 (VS40) es un virus esférico (icosaédrico) de la familia *poliomavirus* que posee un genoma circular constituido por ADN de cadena doble (ADNcd) [3, 66, 124, 125]. La cápside de este virus tiene un diámetro de aproximadamente 45 nm (ver Tabla 3.1) y está formada por 72 pentámeros de la Proteína Viral 1 (PV1), definida como la *principal proteína de la cápside*²² [66]. El VS40 resulta interesante desde el punto de vista biológico por dos razones principalmente [121]: (i) No es sustancialmente *inmunogénico*²³ y, por lo tanto, puede infectar eficazmente una amplia gama de células humanas en estado *latente* [121]. (ii) Tiene una alta tasa de infectividad y una eficiencia de transfección elevada. Estos aspectos hacen del VS40, así como de las modificaciones biológicas del virus o de las partículas virales con características similares, candidatos prometedores para aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo, en terapia genética [126].

Considere una cápside vacía del VS40 con las propiedades geométricas y mecánicas mencionadas previamente,²⁴ es decir, con $n_T = 72$, $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ y $\kappa = 175 k_B T$, resultando en una constante de flexión de $\tilde{f}_r = 5.50$. Dentro del marco teórico del AECV con energía de flexión, y a través de las Ecs. (3.32) y (3.34), es posible estimar la altura de la barrera de energía, ΔG^* , y el número crítico de agregación, n^* , asociadas a ésta cápside. La Figura 3.17 muestra una comparación gráfica de los resultados de estas cantidades con y sin energía de flexión. Se puede ver que el tamaño del núcleo crítico y la altura de la barrera de energía disminuyen.

²²En general, la cápside de un virus está compuesta por múltiples tipos de proteínas. La *principal proteína de la cápside* es la más abundante y estructuralmente significativa. En particular, en un poliomavirus como el VS40, el arreglo espacial de las proteínas PV1 no sigue las reglas de «cuasi-equivalencia» de Caspar y Klug, que describen la organización de los capsómeros en una cápside icosaédrica [5]. En contraste, en el VS40, las proteínas PV1 se encuentran organizadas en una red superficial con simetría $T_r = 7d$, pero formada únicamente por pentámeros [34, 50].

²³La *inmunogenicidad* se refiere a la capacidad de un antígeno para estimular el sistema inmunológico y provocar una respuesta inmune.

²⁴La elección de una cápside del VS40 como ejemplo particular de la aplicación de la TAECV se realizó considerando que las características físicas reales del virus fueran lo más cercanas posible a las suposiciones (físicas y matemáticas) que se utilizan para obtener los resultados teóricos. Por ejemplo, la estimación de la energía de borde de la Sección 2.3.2 es más adecuada para el autoensamblaje de una cápside compuesta de pentámeros. Por lo tanto, utilizarla para estimar propiedades del VMCC, cuyas subunidades proteicas son dímeros [64], sesgaría el resultado de las propiedades físicas del virus. Por otro lado, la TCD supone que la tensión en el plano y la flexión están relacionadas. Si este no es el caso, como podría suceder para un virus con propiedades mecánicas anisotrópicas como el VDR, donde la respuesta mecánica y el módulo de Young son diferentes al *indentar* en distintas orientaciones [120], las aproximaciones de la TCD realizadas en esta tesis no son adecuadas. Por estos argumentos, el VS40 se destaca como uno de los ejemplos más adecuado.

En la siguiente sección, se muestra que el radio de curvatura también se comprime durante el autoensamblaje, lo que conduce a la formación de cápsides de tamaño subóptimo del VS40.

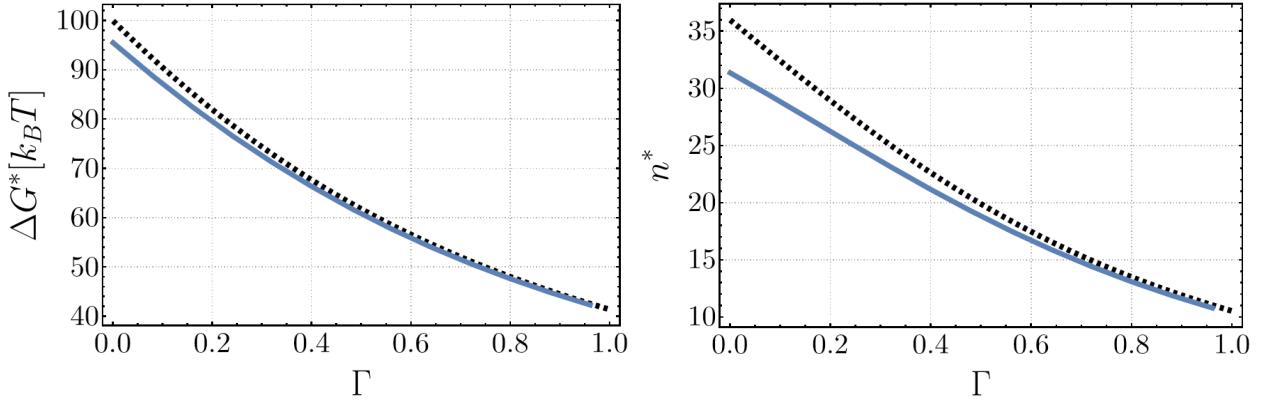


Figura 3.17: Comportamiento de la altura de la barrera de nucleación, ΔG^* , y número crítico de subunidades, n^* , de una cápside vacía del VS40 en función de la supersaturación, Γ . En el panel izquierdo, se muestra una disminución considerable en la altura de la barrera de energía cuando se toma en cuenta la energía de flexión (Ec. (3.34), línea azul) en comparación con el modelo clásico (Ec. (2.73), línea negra discontinua). El panel derecho refleja que el número de capsómeros que componen el núcleo de la cápside (Ec. (3.32), línea azul) es menor que en un sistema que siempre sigue el radio de curvatura preferencial (Ec. (2.72), línea negra discontinua). Para generar los dos gráficos, se utilizó $n_T = 72$, $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ y $\kappa = 175 k_B T$, resultando en una constante de flexión de $\tilde{f}_r = 5.50$.

3.7.3 Mecanismo de Compresión Continua para el Autoensamblaje de la Cápside del VS40

La evidencia experimental muestra que la estructura nativa de la cápside del VS40 tiene 72 pentámeros y un radio de curvatura de 22.5 nm [66, 121, 125]. Por otro lado, la TAECV permite calcular el número de subunidades y el radio de curvatura de una cápside cerrada de este tipo de virus considerando que estos fueran los valores preferenciales. Por lo tanto, considerando $n_T = 72$, $R_T = 22.5$ nm, $\Delta g \approx -15.0 k_B T$, $\kappa = 175 k_B T$ y $\Gamma = 0.72$ (utilizando la Ec. (3.20) y $\Delta\mu = -2.0 k_B T$), y empleando las Ecs. (3.24) y (3.25), se encuentra que el número de cierre es $n_c \approx 42$, mientras que el radio de cierre es $R_c \approx 17$ nm. Estos valores difieren considerablemente del número de agregación y del radio de curvatura preferenciales. Esto implica que, para que la cápside se forme con la estructura óptima observada experimentalmente, los valores preferenciales del número de subunidades y del radio de curvatura tendrían que ser modificados (ver Sección 3.3.1 y Ec. (3.26)) a $n_T = 125$ y $R_T = 29.7$ nm, respectivamente.

Naturalmente, estos valores dependen de la energía de enlace efectiva por subunidad Δg (ver Ec. (3.113)). En el caso en el que $\Delta g \approx -5 k_B T$, el número de cierre y el radio de cierre serían $n_c \approx 55$ y $R_c \approx 20$ nm, respectivamente. Esto indica que los nuevos valores preferenciales serían $n_T = 95$ y $R_T = 26$ nm. Actualmente, el valor preciso de Δg se desconoce, pero puede estimarse como una aproximación basada en resultados de otros virus con simetría icosaédrica [127, 128]. Se requiere de más investigación experimental y de simulaciones computacionales, *e.g.*, Dinámica Molecular (DM), para poder encontrar los valores apropiados de éste y otro parámetros de autoensamblaje.

En la siguiente sección se da una breve descripción del ritmo de nucleación y de desensamblaje de la cápside del VS40.

3.7.4 Cinética de Autoensamblaje del VS40

Los gráficos de la Fig. 3.17 muestran un comportamiento similar a los de las Figs. 3.9 (panel derecho) y 3.11 (panel izquierdo). La barrera de energía, ΔG^* , controla la cinética de autoensamblaje en ambos modelos de AECV (*i.e.*, $J \sim \exp(-\beta\Delta G^*)$, ver Sección 3.5.2). Por lo tanto, el sistema con la menor barrera de energía tendrá la mayor tasa de producción de núcleos de cápsides. La Fig. 3.18, se muestran los ritmos de autoensamblaje y desensamblaje del VS40 en función de Γ , confirmando la aceleración de la formación de cápsides virales teniendo en cuenta la energía de flexión.

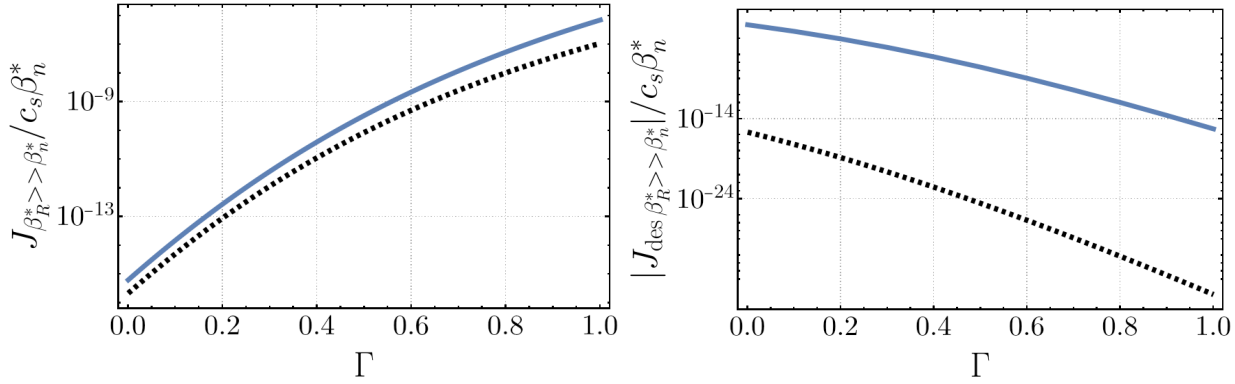


Figura 3.18: Curvas representativas del ritmo de nucleación de autoensamblaje (panel izquierdo), $J_{\beta_R^* \gg \beta_n^*} / c_s \beta_n^*$, y desensamblaje (panel derecho), $|J_{des, \beta_R^* \gg \beta_n^*}| / c_s \beta_n^*$, en el estado estacionario para una cápside del VS40 como función de la supersaturación, Γ . Para generar los dos gráficos, se utilizó $n_T = 72$, $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ y $\kappa = 175 k_B T$. En ambos casos, el ritmo de ensamblaje y desensamblaje en el modelo clásico se representa con una línea negra discontinua.

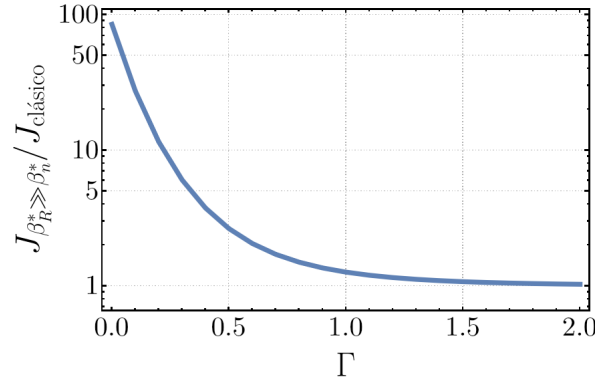


Figura 3.19: Gráfica del cociente de los ritmos de nucleación en el estado estacionario, es decir, $J_{\beta_R^* \gg \beta_n^*} / J_{clásico} \sim \exp(-\beta\Delta G^*) / \exp(-\beta\Delta G_{clásico}^*)$, en función de la supersaturación, Γ . En este gráfico se puede observar la convergencia del ritmo de autoensamblaje con energía de flexión, Ec. (3.108), al resultado del caso clásico, Ec. (2.118) para valores grandes de la supersaturación. Para generar los dos gráficos, se utilizó $n_T = 72$, $\Delta g \approx -15.0 k_B T$ y $\kappa = 175 k_B T$.

Ahora, es relevante observar cómo varía el cociente $J_{\beta_R^* \gg \beta_n^*} / J_{clásico}$ en función del parámetro Γ . Este análisis permite visualizar el incremento relativo en la producción de núcleos y la influencia de Γ , especialmente cuando el estado de supersaturación es alto, es decir, cuando $\Gamma \gg 1$. La Figura 3.19 muestra un ejemplo representativo de $J_{\beta_R^* \gg \beta_n^*} / J_{clásico}$ para el VS40. Se observa que para valores

bajos de la supersaturación el ritmo de nucleación que se obtiene teniendo en cuenta la energía de flexión es más de un 50 % mayor que la predicción clásica. A medida que Γ aumenta, la barrera de nucleación se va haciendo más pequeña de modo que $J_{\beta_R^* \gg \beta_n^*} / J_{\text{clásico}}$ converge a 1.

3.8 Conclusiones

En este capítulo, se generalizó la Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales (TAECV) para estudiar la influencia de la energía de flexión, G_{flex} , en la formación de cápsides esféricas vacías. La extensión, el modelo y los resultados obtenidos de la termodinámica y cinética de autoensamblaje constituyen una de las principales contribuciones de esta tesis. La inclusión de G_{flex} en la energía libre de autoensamblaje proporciona un modelo más «realista» que el modelo clásico, que asume crecimiento a radio fijo, y revela aspectos interesantes de la formación de cápsides víricas.

En este capítulo, se observan y describen dos fenómenos emergentes en el AECV al tener en cuenta la energía de flexión: (i) la comprensión continua del radio de curvatura en un agregado intermedio y (ii) la aceleración del ritmo de ensamblaje y desensamblaje de cápsides virales. Estos fenómenos tienen dos consecuencias importantes: (i) la reducción del tamaño del núcleo crítico y su rápida formación, y (ii) el posible cierre prematuro de las cápsides. Por lo tanto, la presencia de la energía de flexión podría conducir a la producción de cápsides de tamaño subóptimo que no cumplen con las condiciones físicas, estructurales y mecánicas necesarias para garantizar la integridad del genoma viral desde su encapsulamiento en el interior de una célula hospedera hasta su liberación en un organismo susceptible. Estos efectos están asociados a la competencia entre las penalizaciones energéticas del borde de la cápside y su rigidez, caracterizada por la constante de flexión, $\tilde{f}_r$.

Particularmente, se encontró que tanto la altura de la barrera de energía como el tamaño del núcleo crítico en el modelo que considera la flexión son menores en comparación con los resultados del Capítulo 2. Además, los ritmos de autoensamblaje y desensamblaje de cápsides virales son más rápidos cuando se considera la flexión debido al menor tiempo requerido para formar y disociar núcleos más pequeños. Estos efectos disminuyen en cápsides más rígidas (con un valor significativo de κ), por lo que las expresiones que describen estas cantidades en la teoría generalizada se aproximan a los resultados del modelo clásico si $\tilde{f}_r \rightarrow \infty$.

Los procesos dinámicos y cinéticos se estudian mediante dos parámetros de autoensamblaje: la supersaturación, Γ , y $\tilde{f}_r$, los cuales están intrínsecamente relacionados con aspectos fisicoquímicos que gobiernan el AECV, como la concentración de sal y de subunidades libres, pH, fuerza iónica y temperatura. Así, la TAECV puede proporcionar estimaciones de Γ y $\tilde{f}_r$ utilizando la energía de enlace efectiva por subunidad, Δg , y el módulo de flexión, κ , que se podrían estimar experimental o computacionalmente. Esto permite caracterizar la trayectoria de autoensamblaje mediante estos parámetros y dividirla en dos segmentos principales: (i) la Trayectoria de Mínima Energía (TME), en donde el autoensamblaje está dirigido por las fluctuaciones térmicas y (ii) la *trayectoria de compresión*, en donde el cierre de la cápside está determinado por la cinética del proceso. Además, el modelo actual permite definir la estabilidad de las cápsides cerradas en función de condiciones específicas de Γ y $\tilde{f}_r$, una vez que se han fijado otros parámetros, como κ . Estas condiciones ayudan a entender y predecir bajo qué condiciones las cápsides pueden mantener su integridad estructural para proteger el material genético del virus.

En la generalización de la TAECV, es posible calcular el tamaño de las cápsides que se han cerrado, el cual resulta ser menor (siempre que $\tilde{f}_r$ sea finito) que el tamaño observado experimen-

talmente en cápsides nativas. Este hallazgo sugiere que los valores preferenciales de la interacción angular que determinan la curvatura preferencial de los virus podrían ser mayores que los observados en el virus ensamblado nativo. También da pie a pensar posibles mecanismos para inducir un cierre prematuro del virus a tamaños incluso menores, que comprometerían su viabilidad. Este fenómeno fue especialmente analizado en las cápsides del Virus de Simio 40 (VS40).

En la estructura nativa de la cápside VS40 se observa una configuración con 72 pentámeros y un radio de curvatura de 22.5 nm. Sin embargo, la teoría de este capítulo aplicada al VS40 sugiere que los valores de curvatura preferencial de las subunidades proteicas del VS40 serían más grandes que la observada experimentalmente. En otras palabras, la teoría de este capítulo sugiere que cuando dos capsómeros interactúan, tienen un ángulo óptimo de interacción mayor que el ángulo óptimo de la estructura cristalina de una cápside completamente formada. El mecanismo de compresión continua proporciona una explicación plausible de cómo la cápside del VS40 logra su estructura nativa. Estos resultados son fundamentales para caracterizar la formación de cápsides virales, con implicaciones importantes en biología y medicina. La comprensión de este proceso puede proporcionar información crucial para el desarrollo de técnicas que favorezcan o frustren la formación de cápsides virales mediante la imposición de interacciones subunidad-subunidad que impliquen ángulos óptimos diferentes a los necesarios para formar cápsides nativas. Además, estas ideas podrían ser útiles en el desarrollo de nuevos tratamientos antivirales.

Se requieren más investigaciones para validar este mecanismo y obtener una comprensión más completa del proceso de autoensamblaje. Algunas de estas nuevas investigaciones se mencionan brevemente al final de la tesis, donde se discuten las posibles futuras líneas de investigación del AECV.

En el siguiente capítulo, se estudian las consecuencias de la inclusión de un molde rígido en el AECV vacías.

3.9 El MFA Para Determinar Propiedades Mecánicas de Cápsides Virales

La exploración de los mecanismos empleados por la naturaleza en la creación de nanocontenedores altamente resistentes, como las cápsides virales [24] y los *microcompartimentos bacterianos* [129], requiere del análisis profundo de las propiedades materiales y mecánicas a escala nanométrica de estas estructuras. En este ámbito, el surgimiento del Microscopio de Fuerza Atómica (MFA) en 1986²⁵ [131], y sus continuos avances, han destacado como una poderosa herramienta para obtener detalles nanoestructurales sin dañar la superficie de la muestra [130]. Sus aplicaciones incluyen el análisis de biomoléculas, virus, células y su material genético [1, 132-135]. Particularmente, el MFA ha demostrado ser un valioso instrumento en el estudio de las propiedades mecánicas de cápsides virales individuales en condiciones experimentales similares a las fisiológicas [25, 99-102].

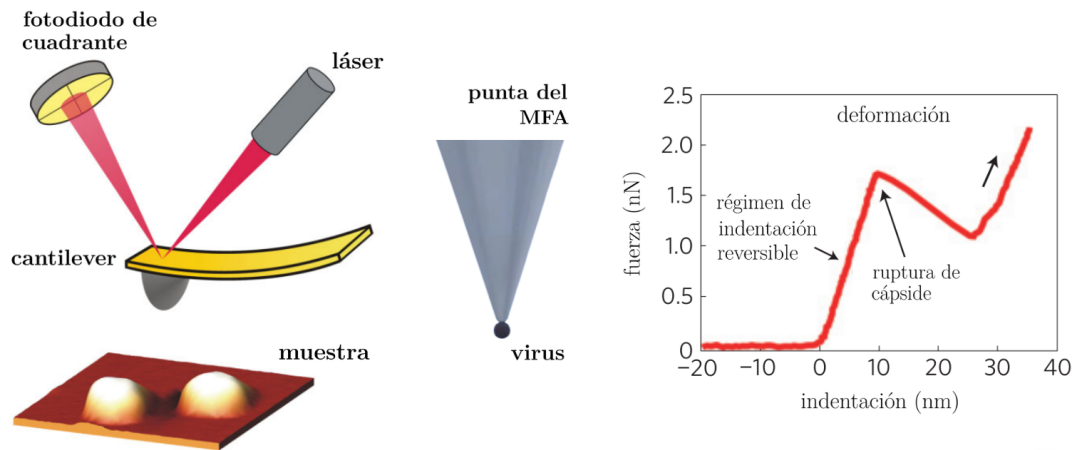


Figura 3.20: Representación esquemática de la configuración experimental de nanoindentación de virus con un MFA. La muestra (depositada sobre un portaobjetos porta-objetos) o el *cantilever* se monta sobre un *piezo-scanner* para desplazarse en todas las direcciones. La punta del MFA es localizada en el centro del virus, y se utiliza para aplicar una fuerza sobre el virus. Esta fuerza deforma al virus y dobla el cantilever, lo cual se registra en el *fotodiodo de cuadrante*. La señal de fotodiodo es una medida de la fuerza aplicada en la muestra y a partir de ella se puede generar una *gráfica fuerza-indentación* en donde se identifica (i) el régimen de indentación reversible e irreversible (ii) la indentación o deformación relativa y (iii) la fuerza necesaria para romper el virus. Figura adaptada de [99, 136] (panel izquierdo: diagrama de nanoindentación de virus con MFA) y [25] (panel derecho: gráfica genérica de fuerza-indentación).

Los experimentos de *nanoindentación* que utilizan un MFA en el estudio de la mecánica viral, determinan, esencialmente, la fuerza con la que responde el virus en función de la *indentación*, *i.e.*, la diferencia entre la «altura» del virus deformado y la original. A través de la pendiente de la curva fuerza-indentación es posible medir la constante del muelle del virus, k_{vir} . Además, se pueden obtener otras medidas mecánicas de los virus como la fuerza umbral para la deformación irreversible de las cápsides, F_{def} o la fragilidad y fatiga de los virus. A partir de la constante del muelle, se puede estimar el *módulo de Young*, E , el cual varía desde los valores del *polietileno* hasta el *plexiglas* [25]. En la Fig. 3.20, se muestra una representación esquemática de la configuración experimental de nanoindentación de virus con un MFA.

²⁵Descendiente de primera generación del Microscopio de Túnel de Barrido (MTB), el MFA tiene la capacidad de capturar imágenes de superficies conductoras y no conductoras [130]. Por esta razón, este microscopio se posiciona como la opción óptima para la visualización de materiales biológicos con baja conductividad electrónica.

3.9.1 Una Estimación Simple del Módulo de Flexión

La mayoría de las mediciones en partículas virales individuales mediante el uso de un MFA se han realizado en virus con simetría esférica (icosaédrica) [99]. Las cápsides estudiadas hasta ahora muestran un comportamiento inicial de indentación lineal, como se observa en la gráfica fuerza-indentación de la Fig. 3.20. Esta respuesta lineal es la que predice la teoría continua de elasticidad en el límite de cáscaras delgadas. Por lo tanto, bajo estas consideraciones, una cápside viral se puede modelar a través de la Teoría de Cáscaras Delgadas (TCD) [25, 99, 137, 138]. Una cáscara delgada se refiere a una estructura cuyo espesor es mucho menor que sus dimensiones en las otras dos direcciones [137, 138]. En relación con el tema abordado en esta sección, en esta cáscara delgada que modela una cápside esférica vacía, el principal modo de deformación es la flexión. Por lo tanto, la pared de la cápside se comporta como una membrana flexible que se estira a lo largo de un marco curvo [36, 139], mientras que la tensión en su modo de estiramiento y corte de plano se tratan como efectos secundarios despreciables. Atendiendo a estos argumentos, la cápside sufrirá una deformación con flexión uniforme y su superficie media permanecerá esférica.²⁶

En este marco teórico, se define el número de Föppl-von Kármán (FvK), γ_{FvK} en términos del módulo de flexión, κ , y el módulo de Young bidimensional, Y , [25, 32, 43, 137, 140]

$$\gamma_{\text{FvK}} = \frac{Y R^2}{\kappa}, \quad (3.114)$$

siendo R el radio instantáneo de curvatura. Este número de FvK caracteriza la importancia del esfuerzo en el plano en relación con la energía de flexión. Ahora, asumiendo que la anisotropía de la estructura de la cápside es débil, *i.e.*, que las propiedades físicas son prácticamente iguales en todas las direcciones, y que su *coeficiente de Poisson*, ν_p , es cercano al valor característico de las proteínas, *i.e.*, $\nu_p \approx 0.4$ [119, 141], el valor del número de FvK se puede estimar como [25, 139]

$$\gamma_{\text{FvK}} = 12(1 - \nu_p^2) \left(\frac{R}{h} \right)^2, \quad (3.115)$$

en donde h es el espesor de la cápside. Combinando las dos ecuaciones anteriores, y resolviendo para κ , se tiene que

$$\kappa = \frac{Y h^2}{12(1 - \nu_p^2)}. \quad (3.116)$$

Finalmente, suponiendo que Y está relacionado con el módulo de Young tridimensional, E , a través de la siguiente expresión: $Y = Eh$ [25], entonces, una estimación apropiada de κ es

$$\kappa = \frac{E h^3}{12(1 - \nu_p^2)}. \quad (3.117)$$

²⁶Cabe destacar que el rango de validez de la implementación de la TCD para describir el comportamiento elástico de cápsides virales depende tanto del grado de deformación como del nivel de precisión deseado.

Autoensamblaje de Cápsides Virales sobre un Molde Esférico

4.1 Introducción

Las cápsides virales se ensamblan a partir de uno o algunos pocos tipos de proteínas [5, 24, 142], que han sido denominadas *subunidades proteicas* o *subunidades libres*. Estas subunidades forman estructuras complejas de manera espontánea como resultado de una, o una combinación, de los siguientes tres tipos de interacciones efectivas [52]: interacciones subunidad-subunidad, interacciones genoma-subunidad, en los casos en los que la cápside se ensambla alrededor del genoma viral, e interacciones andamiaje-subunidad, cuando las *proteínas de andamiaje* están presentes.

Las proteínas de andamiaje fueron inicialmente estudiadas en los bacteriófagos P22 [143] y T4 [144]. Más adelante se descubrieron proteínas de andamiaje en otros virus, como el Virus del Herpes Simple 1 (VHS-1) [145]. En todos estos virus, se identificaron ciertas proteínas que participan activamente en la formación de sus cápsides, pero que están ausentes en las cápsides maduras y en los *viriones*. Además, se encontraron análogos funcionales de estas proteínas en forma de andamios compuestos de enzimas y reactivos, que actúan como «*chaperones moleculares*» y participan en el autoensamblaje de diversos complejos macromoleculares, como los microcompartimentos bacterianos [146-148]. En términos simples, las proteínas de andamiaje pueden definirse como aquellas que favorecen activamente las interacciones subunidad-subunidad, actuando como reguladores de las «*trayectorias*» de autoensamblaje, promoviendo la nucleación y, a la vez, previniendo la malformación de agregados macromoleculares [51, 129, 149].

Numerosos investigadores, incluidos los autores de [51, 149-151], han sugerido que muchos virus de ARN o ADN de cadena doble, como el VHS-1 [144, 145] o el Virus de la Enfermedad de Bursitis Infecciosa (VEBI) [152], y ciertos bacteriófagos, como el bacteriófago P22 [143] o el bacteriófago T4 [153], generalmente requieren una *plantilla* o un núcleo interno que moldee o catalice la formación de su cápside a lo largo de una determinada «*trayectoria*» de autoensamblaje. Durante el Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV), las proteínas de andamiaje pueden encontrarse de dos maneras diferentes [51, 149]: (i) como núcleos internos y (ii) disociadas en una solución acuosa. Es decir, las proteínas de andamiaje podrían agregarse (incluso en ausencia de las subunidades proteicas) formando un andamio sólido¹ sobre el cual posteriormente se adhieren las subunidades proteicas, o bien las proteínas de andamiaje y las subunidades libres podrían autoensamblarse conjuntamente.

¹Si bien algunos autores utilizan únicamente uno de los términos, ya sea, *andamio* o *andamiaje*, para referirse a una estructura proteica preexistente que sirve como base o guía para el AECV, en esta tesis se utilizan ambos términos de forma indistinta e intercambiable.

El estudio de los mecanismos de AECV en presencia de proteínas de andamiaje ha llevado a la fabricación de nanobiomateriales de alta precisión y complejidad [154]. Estos nanobiomateriales tienen prometedoras aplicaciones como vehículos nanométricos para encapsular y entregar ciertas cargas en diferentes tipos de células [155, 156], como reguladores de interacciones entre enzimas y sustratos [157] y como andamios que imitan la matriz extracelular, los cuales buscan emplearse en ingeniería de tejidos [158]. Motivado por el importante papel que desempeñan las proteínas de andamiaje en el ciclo de replicación de numerosos virus y sus posibles aplicaciones en biotecnología, en este capítulo se introduce la modelización de la interacción andamiaje-subunidad en la Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales (TAECV). Las contribuciones de la tesis en este capítulo se centran en el modelado teórico de la formación de cápsides vacías en presencia de proteínas de andamiaje, las cuales adoptan la forma de un molde esférico preformado. Para ello, se utilizan las metodologías desarrolladas en los Capítulos 2 y 3, obteniendo resultados novedosos que enriquecen la teoría y son aplicables no solo a cápsides virales, sino también al autoensamblaje de estructuras complejas como los microcompartimentos bacterianos.

Matemáticamente, la extensión de la teoría consiste en la adición de la energía de interacción andamiaje-subunidad, G_{molde} , a la energía libre de Gibbs de autoensamblaje de la Ec. (3.1) desarrollada en el Capítulo 3. Esta ecuación considera la diferencia de energía entre tener n subunidades proteicas en la cápside o libres en la solución, $n\Delta\mu$, la penalización energética del borde, $\tau_\lambda, l(n, \theta, R)$, y el costo energético, G_{flex} , producido por las desviaciones de la curvatura instantánea respecto a la curvatura preferencial, R_T .

La modelización e implementación de la interacción andamiaje-subunidad permite determinar, caracterizar y predecir, en términos de unos pocos parámetros accesibles experimental o computacionalmente, los efectos físicos y características estructurales que emergen debido a la presencia de un andamiaje en forma de un molde esférico. La sencillez del modelo propuesto en esta tesis facilita la interpretación de resultados teóricos y proporciona las herramientas necesarias para realizar predicciones útiles sobre el ensamblaje de las cápsides e identificar las modificaciones resultantes en los elementos físicos clave de la teoría. Específicamente, estos elementos incluyen la altura de la barrera de energía, ΔG^* , el número crítico de agregación, n^* , y el ritmo de nucleación o autoensamblaje, J . El capítulo se divide en las siguientes secciones:

En la Sección 4.2, se introduce un modelo básico para la implementación de una población de proteínas de andamiaje en forma de un molde esférico preformado en la solución, donde la *interacción andamio-subunidad* se reemplaza por una *interacción molde-subunidad*.

Posteriormente, en la Sección 4.3, se deriva la energía libre de autoensamblaje para una cápside que se ensambla en presencia del molde, y se discute el significado físico de los parámetros involucrados. Además, se presentan los resultados de la teoría para una cápside que se ensambla fuera de la curvatura del molde, pero manteniendo un contacto «puntual» con este. En este sistema, se analizan las modificaciones en el tamaño crítico, la barrera de energía, el régimen de estabilidad y el ritmo de nucleación, contrastando estos resultados con aquellos de los Capítulos 2 y 3.

Luego, la Sección 4.4 se dedica al análisis del AECV sobre el molde, discutiendo todos los aspectos relevantes de este proceso, incluyendo la nucleación, la cinética del proceso, el régimen de estabilidad y la influencia del tamaño del molde en las vías de autoensamblaje.

En la Sección 4.5, se aplican los conceptos de la cinética de la Sección 2.4 para determinar el ritmo de autoensamblaje de cápsides sobre el molde esférico. Se discute el papel de la interacción molde-subunidad y el tamaño del molde.

La Sección 4.6 introduce el concepto de *diagrama de fase de autoensamblaje*, define los componentes de estos diagramas y presenta una analogía con los diagramas de fase *típicos* en termodinámica.

Los diagramas de fase de autoensamblaje están distribuidos en varias secciones, lo cual facilita una explicación clara y continua. A continuación se presenta un *mapa* que describe dónde se encuentran estos diagramas y cuál es su propósito en la investigación: Los diagramas de fase de la Sección 4.7 evalúan la energía libre escalada de cápsides cerradas y proporcionan información sobre el mecanismo que resulta en las cápsides más estables. Por otro lado, en la Sección 4.8 se proporcionan diagramas de fase para determinar si es energéticamente favorable que las cápsides se ensamblen en presencia o ausencia de un molde preformado, considerando la altura de la barrera energética. La Sección 4.9 combina dos criterios energéticos para generar diagramas de autoensamblaje que permiten determinar cuál configuración es más favorable tanto dinámica como cinéticamente.

Finalmente, en la Sección 4.15, se analiza el AECV en función de las desviaciones de curvatura del molde respecto a la curvatura preferencial. Se destaca el papel de la asimetría en la energía de flexión y se explican las rutas de autoensamblaje favorables.

4.2 Modelo de la Interacción Andamiaje-Subunidad

En 2018, S. Li y colaboradores investigaron el papel de las proteínas de andamiaje en el AECV [151]. Utilizando modelos teóricos y simulaciones computacionales, explicaron por qué ciertos virus esféricos (icosaédricos) *grandes* requieren proteínas de andamiaje para formar las estructuras óptimas de sus cápsides. Su enfoque se centró en el tamaño final de la cápside y en cómo este se ve afectado por la presencia o ausencia de un núcleo esférico interno que interactúa con las subunidades proteicas. Además, determinaron la ubicación de las disclinaciones, es decir, los sitios sobre una red hexagonal donde se encuentran pentámeros, en cápsides que siguen el principio de «cuasi-equivalencia» de Caspar y Klug [5] a través del criterio de mínima energía. Sin embargo, no abordaron los estados intermedios del autoensamblaje, trataron implícitamente la interacción atractiva entre el núcleo y las subunidades proteicas en el modelo teórico, y, de manera muy superficial, los aspectos relacionados con la nucleación, *e.g.*, la barrera de energía que se debe superar para un autoensamblaje espontáneo. Estos factores, junto con la cinética, son importantes, ya que podrían influir significativamente en las vías de autoensamblaje, el tamaño crítico de los embriones de la cápside, su tamaño final y en los requisitos fisicoquímicos para un autoensamblaje exitoso.

En una investigación más reciente del año 2021, centrada en los microcompartimentos bacterianos, F. Mohajerani y colaboradores [148] desarrollaron un modelo teórico simple como parte de un estudio más amplio sobre el ensamblaje de una cubierta proteica que encapsula moléculas de carga y proteínas de andamiaje. Su objetivo era comprender la interacción entre las propiedades del andamio y la cubierta de proteínas. Sin embargo, no consideraron individualmente los efectos de las proteínas de andamiaje ni abordaron la nucleación ni la cinética del autoensamblaje en el contexto del ciclo de replicación viral.

Con el propósito de relacionar la presencia de proteínas de andamiaje con la física del autoensamblaje de cápsides vacías, especialmente su impacto en el tamaño crítico, la barrera de energía y la cinética, se propone el siguiente modelo básico.

Una población de proteínas de andamiaje, representada físicamente como un *molde esférico* de radio R_m , y esquemáticamente ilustrada como una esfera verde tenue en las Figs. 4.1 y 4.2, se encuentra preformado dentro de una solución acuosa. Las subunidades proteicas del virus, mostradas como pequeñas esferas de tonalidad naranja, están presentes en esta solución y se difunden libremente. Estas subunidades tienen asociado un *radio de curvatura preferencial*, R_T y un *número de*

agregación preferencial, n_T . En las condiciones ambientales adecuadas, que involucran concentraciones apropiadas de subunidades libres y salinidad, así como pH y temperatura, las fluctuaciones térmicas inducen la formación de agregados de proteínas, que a su vez, interactúan con el molde esférico. Las interacciones subunidad-subunidad y andamiaje-subunidad, o más precisamente, *interacciones molde-subunidad* o *interacciones molde-capsómero* como serán referidas a partir de ahora, junto con el efecto de competición de las penalizaciones energéticas, darán lugar a la formación de cápsides parciales que, en determinado momento, contarán con cierto *número instantáneo de subunidades*, n , y *radio instantáneo de curvatura*, R . En el AECV, el radio R podría ser diferente tanto a R_m como a R_T (ver Fig. 4.1) o podría ser que la cápside se ensamble sobre el molde, *i.e.*, $R = R_m \neq R_T$ (véase la Fig. 4.2). En ambos casos, estas condiciones se traducen en un costo energético de flexión, G_{flex} , que se describe con la Ec. (3.3), y en última instancia en un efecto de competición entre el coste energético que se requiere para desviarse de la curvatura preferencial y la disminución de energía que se consigue al autoensamblarse cerca del radio del molde o directamente sobre este. De la misma forma que en los dos modelos previos, correspondientes a los dos capítulos anteriores, la agregación de proteínas induce la formación de un borde de longitud $l(n, \theta, R)$ sobre el cual se añaden más subunidades a medida que el agregado crece. La presencia del borde crea una penalización de energía que es modelada como $\tau_\lambda l(n, \theta, R)$ (ver Secciones 2.3.2 y 3.2).

La Figura 4.1 muestra el proceso de AECV en presencia de un molde esférico cuando la cápside se ensambla a un radio que es diferente tanto a R_m como a R_T , mientras que la Fig. 4.2 muestra una cápside parcial y una cápside cerrada cuando $R_m < R_T$ (panel izquierdo) y $R_m > R_T$ (panel derecho). En estas ilustraciones, el tamaño final de una cápside nativa, *i.e.*, aquella que sigue *valores preferenciales* n_T y R_T se muestra como una esfera de radio R_T de color azul tenue.

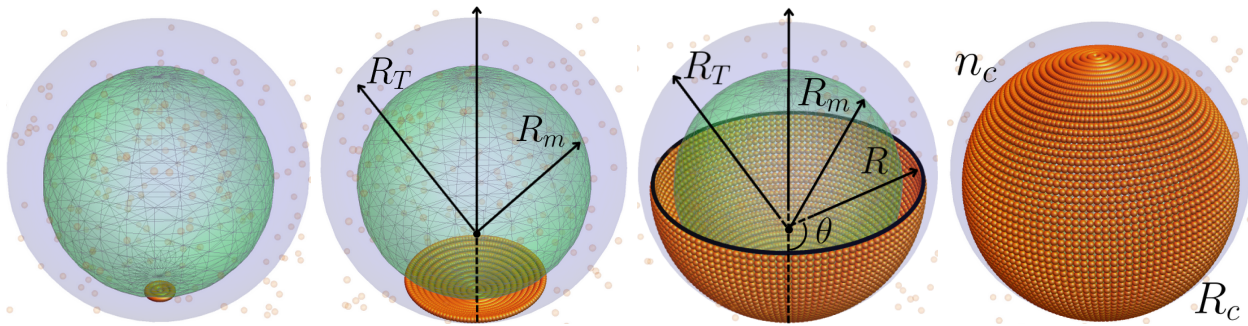


Figura 4.1: Representación esquemática del autoensamblaje de una cápside viral con energía de flexión en presencia de un molde esférico cuando $R \neq R_m \neq R_T$. El proceso de autoensamblaje se despliega de izquierda a derecha: Inicialmente, las subunidades libres comienzan a asociarse formando agregados que actúan como un embrión o núcleo de la cápside, el cual crece hasta formar una cubierta proteica cerrada. Durante este proceso, la competencia entre la energía de unión, $n\Delta\mu$, la energía de adsorción debida al molde, G_{molde} , la energía de borde, $\tau_\lambda l(n, \theta, R)$, y la energía de flexión, G_{flex} , impulsa el autoensamblaje para $n < n_T$ y, por lo tanto, para $R < R_T$. Al culminar, la cápside completa consta de n_c subunidades y tiene un radio R_c .

En la siguiente sección, se deriva la estructura matemática de la energía libre de Gibbs de autoensamblaje, considerando la interacción molde-subunidad como una *energía de adsorción*.

4.3 Energía Libre de Autoensamblaje en (n, R)

En presencia de proteínas de andamiaje en la forma de un molde esférico preformado, la expresión matemática de la energía libre contiene, en comparación con la Ec. (3.1), un término adicional que representa la energía de adsorción de subunidades libres en el molde esférico,² G_{molde} , y describe esencialmente la interacción molde-subunidad. Este nuevo término se introduce como una extensión de la TAE CV y es concebido como n veces el *potencial químico de adsorción*, $\Delta\mu_m$, siendo n el número de subunidades que está *en contacto* con el molde. Por lo tanto, el trabajo de formación de una cápside compuesta por n subunidades y un radio de curvatura R , en presencia de un molde esférico y que considera las penalizaciones energéticas de borde y flexión, se puede expresar como una generalización de la Ec. (3.18). Así, la energía libre de autoensamblaje en la representación (n, R) es³

$$\begin{aligned}\Delta G(n, R) &= n\Delta\mu + \tau_\lambda l(n, R) + G_{\text{flex}} + G_{\text{molde}} \\ &= n\Delta\mu + \Delta\mu_m + 2\pi\kappa \frac{n}{n_T} \left(\frac{R_T}{R} - 1 \right)^2 + \lambda_T \frac{R_T}{R} \sqrt{n \left(n_T \frac{R^2}{R_T^2} - n \right)},\end{aligned}\quad (4.1)$$

cuando la cápside se ensambla tocando el molde en un solo «*punto*» (como se indica en la Fig. 4.1), y

$$\Delta G(n) = n(\Delta\mu + \Delta\mu_m) + 2\pi\kappa \frac{n}{n_T} \left(\frac{R_T}{R_m} - 1 \right)^2 + \lambda_T \frac{R_T}{R_m} \sqrt{n \left(n_T \frac{R_m^2}{R_T^2} - n \right)},\quad (4.2)$$

cuando la cápside se ensambla sobre el molde (adoptando uno de los dos posibles escenarios mostrados en la Fig. 4.2). Por un lado, en la Ec. (4.1), G_{molde} representa una constante energética que no varía con n , ya que en este caso la cápside parcial y el molde tienen contacto a través de una sola subunidad, interactuando en un único «*punto*» (ver Fig. 4.1). Por otro lado, en las dos ecuaciones anteriores, $\Delta\mu$ representa el *potencial químico* asociado a la diferencia de energía entre tener las n subunidades proteicas agregadas en la cápside o libres en la solución (Ec. (2.52)). Además, $l(n, R)$ indica la longitud del borde de la cápside en función de n y R (Ec. (3.17)), λ_T es la *constante de energía de borde* (Ec. (3.19)), κ representa el módulo de flexión (Ec. (3.117)), y G_{molde} se implementa como $\Delta\mu_m$ o $n\Delta\mu_m$, según el caso. La Ec. (4.1) depende de los valores instantáneos de subunidades y de curvatura, n y R , mientras que la Ec. (4.2) solo depende de n , ya que se asume que la cápside crece sobre el molde fijando su radio de curvatura a R_m . Ambas ecuaciones están influenciadas por los valores preferenciales n_T y R_T .

²La molde preformado por las proteínas de andamiaje se ha definido como un molde esférico de radio R_m . Sin embargo, debido a la simplicidad de su modelado, este molde podría adoptar diversas formas manteniendo el mismo efecto sobre el AECV. Esto lo convierte en un «*molde preformado no especificado*», similar al del enfoque computacional desarrollado en [151], donde se utilizó un potencial de Lennard-Jones para cuantificar la interacción de las proteínas de la cápside con el andamiaje esférico.

³Las ecuaciones (4.1) y (4.2) pueden derivarse usando el formalismo de la física estadística al incorporar una forma más general del grado de libertad de traslación en la función de partición de la Ec. (2.16). Finalmente, debido a que en general $G_{\text{molde}} = n\Delta\mu_m$, habrá una energía de enlace efectiva por subunidad como la que aparece en la Ec. (2.53), pero asociada al molde, *i.e.*, Δg_m .

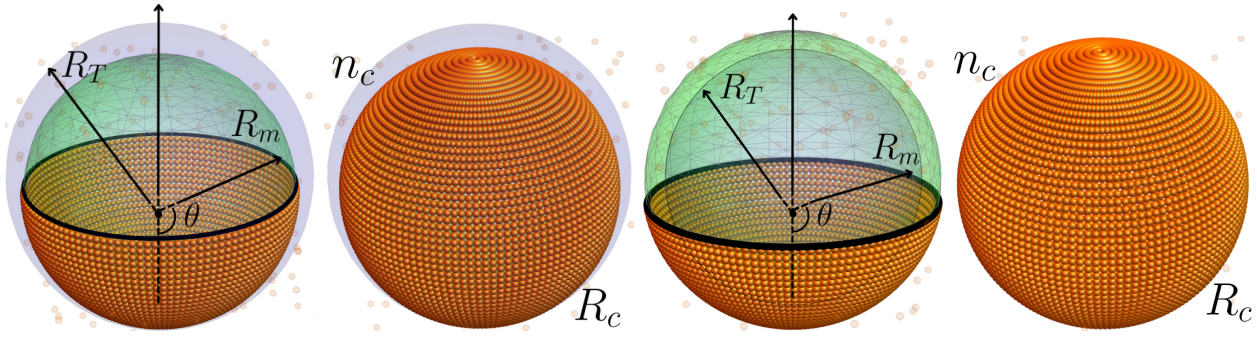


Figura 4.2: Representación esquemática del autoensamblaje de una cápside viral sobre un molde esférico. En el panel izquierdo, se muestra una cápside parcial y una cápside cerrada cuando $R_m < R_T$, mientras que en el panel derecho se muestran estos dos estados cuando $R_m > R_T$.

Al dividir la energía libre de Gibbs de la Ec. (4.2) por el producto $\lambda_T n_T$, utilizando las variables adimensionales $n_r \equiv n/n_T$ y $R_r \equiv R/R_T$ (y por ende $R_{rm} \equiv R_m/R_T$) se obtiene la energía libre escalada, $\Delta\mathcal{E}(n_r, R_{rm})$, asociada a este sistema, a saber,⁴

$$\Delta\mathcal{E}(n_r) \equiv \frac{\Delta G(n, R_m)}{\lambda_T n_T} = \frac{n_r}{\lambda_T} (\Delta\mu + \Delta\mu_m) + \frac{2\pi\kappa n_r}{\lambda_T n_T} \left(\frac{1}{R_{rm}} - 1 \right)^2 + \sqrt{n_r \left(1 - \frac{n_r}{R_{rm}^2} \right)}. \quad (4.3)$$

Con el fin de describir el fenómeno de AECV con el menor número de parámetros adimensionales posible, como se hizo en los Capítulos 2 y 3, se establece que

$$\Delta\mu_m \equiv \delta \Delta\mu. \quad (4.4)$$

en donde δ es un factor de proporcionalidad. La definición anterior indica la posibilidad de determinar la diferencia de energía que representa tener n subunidades libres en solución o en contacto con el molde en términos de $\Delta\mu$. En otras palabras, se busca cuantificar la «atracción» de las subunidades proteicas libres hacia el molde mediante la *energía de enlace efectiva por subunidad*, Δg , y la concentración de proteínas, c_1 (véase la Ec. (2.52)). Por ejemplo, si $\delta > 1$, entonces las subunidades proteicas interactúan más fuertemente con el molde que entre ellas. En cambio, si $0 < \delta < 1$,⁵ hay una atracción efectiva de las subunidades hacia el molde, pero es menor en comparación con las interacciones entre subunidades.

En este modelo de AECV, destacan dos particularidades interesantes. Primero, es necesario enfatizar que la forma en la que se ha implementado la energía de adsorción entre subunidades libres y el molde esférico representa un modelo preliminar. La simplicidad del mismo incorpora los efectos del molde a través de una energía o potencial químico de adsorción, como se indica al escribir las Ecs. (4.1) y (4.2), y permite hacer la siguiente analogía: si $\delta > 0$, la presencia del molde es equivalente a tener una mayor energía de unión entre subunidades proteicas, un menor potencial

⁴Un procedimiento similar puede aplicarse a la Ec. (4.1), lo que resultaría en la Ec. (3.21) sumando $\Delta\mu_m/\lambda_T n_T$.

⁵Es crucial recordar que, según el marco teórico presentado en la Sección 2.3, el autoensamblaje solo puede ocurrir cuando el potencial químico es negativo. Este requisito es necesario para contrarrestar la penalización energética asociada con dos aspectos clave: (i) la extracción de una subunidad de la solución y su ubicación en una cápside en formación, y (ii) la desviación de la curvatura preferida durante el crecimiento de la cápside. Sin esta condición, el proceso de autoensamblaje no se produce de manera espontánea. En resumen, es fundamental compensar las penalizaciones energéticas descritas por el segundo y tercer término de la Ec. (4.3) para desencadenar el autoensamblaje. Además, incluso en presencia de estas condiciones favorables, se debe superar una barrera energética para formar un embrión con el tamaño óptimo que permita un crecimiento posterior.

químico efectivo (hacia números negativos), y un aumento de la *supersaturación*, Γ (ver Ec. (4.5)). Por lo tanto, favorece una disminución, en comparación con los resultados los Capítulos 2 y 3, de la altura de la barrera de energía, ΔG^* , y el tamaño crítico de agregación (n^*, R^*) .⁶

Por otro lado, si $\delta < 0$ entonces existe una repulsión entre el molde y las subunidades, que elimina cualquier ventaja de ensamblarse sobre el molde y hace el proceso ocurra siempre fuera del molde.

Utilizando las mismas definiciones de la *supersaturación*, Γ y la *constante de flexión*, $\tilde{f}_r$, de capítulos anteriores (consúltese las Ecs. (2.69) y (3.20)) y definiendo el *factor de escalamiento*,⁷ γ_m , como

$$\Gamma \equiv -\frac{\Delta\mu}{\lambda_T}, \quad \tilde{f}_r \equiv \frac{2\pi\kappa}{\lambda_T n_T} \quad \text{y} \quad \gamma_m \equiv (1 + \delta), \quad (4.5)$$

entonces, la energía libre escalada que se deriva de la Ec. (4.1) para el ensamblaje tocando el molde en un punto toma la siguiente forma (contrastar con la Ec. (3.21)):

$$\Delta\mathcal{E}(n_r, R_r) = n_r \left[\tilde{f}_r \left(\frac{1}{R_r} - 1 \right)^2 - \Gamma \right] + \frac{\Delta\mu_m}{\lambda_T n_T} + \sqrt{n_r \left(1 - \frac{n_r}{R_r^2} \right)}, \quad (4.6)$$

mientras que la Ec. (4.3) para la formación de la cápside sobre el molde se puede escribir como sigue:

$$\Delta\mathcal{E}(n_r) = n_r \left[\tilde{f}_r \left(\frac{1}{R_{rm}} - 1 \right)^2 - \gamma_m \Gamma \right] + \sqrt{n_r \left(1 - \frac{n_r}{R_{rm}^2} \right)}. \quad (4.7)$$

4.3.1 AECV Tocando el Molde en un Punto

Debido a que la única diferencia entre la energía de formación cuando la cápside toca el molde en un punto, Ec. (4.6), y en ausencia de molde, descrita por la Ec. (3.21), reside en el término constante $\Delta\mu_m/\lambda_T n_T$, la implementación del molde en la TAECV que se ensamblan con $R \neq R_m \neq R_T$ no modifica la mayor parte de los resultados obtenidos en el Capítulo 3. Esto incluye la Trayectoria de Mínima Energía (TME), el tamaño crítico (R_r^*, n_r^*) , la pérdida de confinamiento en la dirección R , y la formación de cápsides cerradas de tamaño menor al preferencial, con un número de subunidades n_c y un radio R_c , que se determinan a través de las Ecs. (3.24) y (3.25), respectivamente. Únicamente modifica la altura de la barrera de nucleación y las condiciones de estabilidad, incluyendo la Supersaturación Mínima de Frontera (SMF), Γ_{front} , y la *cota superior de la diferencia de potencial químico*, $\Delta\mu_{\text{cotsup}}$, las cuales en este caso pasan a ser

$$\Gamma_{\text{front}} = \frac{1}{8\tilde{f}_r} \left[\left(2^{1/3} + 2\tilde{f}_r^{2/3} \right)^{3/2} - 2\sqrt{2}\tilde{f}_r \right]^2 - \frac{\Gamma_m}{n_{rc}}, \quad (4.8)$$

y

$$\Delta\mu_{\text{cotsup}} = \frac{\pi\Delta g}{16\tilde{f}_r\sqrt{n_T}} \left[\left(2^{1/3} + 2\tilde{f}_r^{2/3} \right)^{3/2} - 2\sqrt{2}\tilde{f}_r \right]^2 + \frac{\Delta\mu_m}{n_T n_{rc}}, \quad (4.9)$$

respectivamente. Estas igualdades son muy similares a las Ecs. (3.28) y (3.29) y solo incluyen un término adicional, $\Gamma_m \equiv -\Delta\mu_m/\lambda_T n_T$ (una supersaturación escalada asociada a la diferencia de potencial químico de adsorción) y $\Delta\mu_m/n_c$, respectivamente.

⁶Una consecuencia que se deduce rápidamente a partir de una de las conclusiones del Capítulo 2; la disminución (hacia números negativos) del potencial químico es equivalente a encaminarse hacia las condiciones que favorecen el AECV (ver Sección 2.3.4).

⁷El factor de escalamiento es una medida de la intensidad de atracción entre el molde y las subunidades libres relativa a la energía de unión $\Delta\mu$.

La adición de estos términos señala que, cuando existe contacto de una subunidad con un molde, la región de cápsides estables se amplía en comparación con los resultados del Capítulo 3. En la Fig. 4.3, se muestra el contraste de las regiones de estabilidad y metaestabilidad que se obtienen para el AECV en contacto por un punto o sin un molde esférico. Físicamente, este comportamiento es debido a la reducción en la energía de la cápside cerrada debida a la energía de adsorción. A medida que $\tilde{f}_r$ aumenta, la ventaja energética de tener un contacto «puntal» con el molde pierde relevancia, haciendo que la frontera de estabilidad con molde (curva naranja) se aproxime a la frontera de estabilidad sin molde (curva azul).

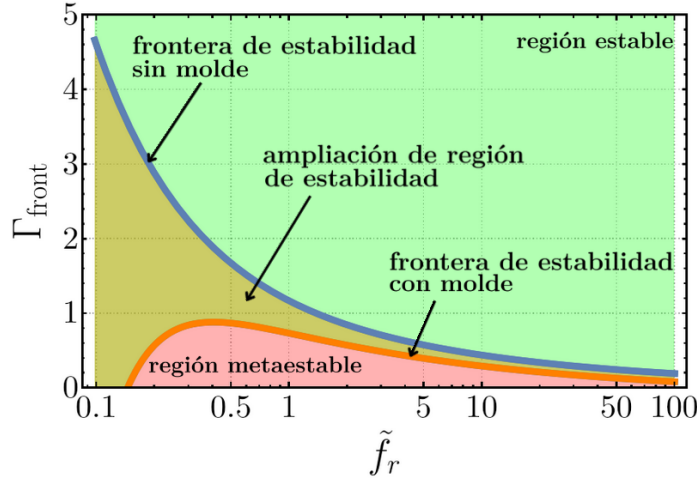


Figura 4.3: Comparación del régimen de estabilidad de cápsides virales cerradas que se han autoensamblado sin un molde esférico preformado o en contacto con él únicamente en una subunidad (ver Fig. 4.1). En verde se muestra la región de cápsides estables, mientras que en rojo se representa la región de cápsides metaestables. Dentro de la región estable, cualquier combinación de los parámetros Γ y $\tilde{f}_r$ asegura la formación de una cápside que, aunque de tamaño subóptimo, tiene una energía libre (escalada) menor a cero. Por otro lado, la elección de una combinación de parámetros en la región roja conduce a una cápside metaestable. La línea azul representa la frontera de estabilidad del AECV sin molde, determinada por la Ec. (3.28), mientras que la línea naranja es la frontera de estabilidad cuando $\gamma_m = 0.1$ (ver Ec. (4.8)). La región amarilla muestra la ampliación del dominio de valores $(\Gamma, \tilde{f}_r)$ que forman cápsides estables debido al contacto con el molde en una subunidad. Se observa que la ampliación de la región estable debida al molde disminuye conforme $\tilde{f}_r$ aumenta.

En la siguiente sección, se analizará cómo se modifica la altura de la barrera de energía, el tamaño del núcleo crítico y el ritmo de autoensamblaje para el modelo en cuestión.

4.3.2 AECV en Contacto Puntual con el Molde: La Barrera de Energía y el Ritmo de Nucleación

Teniendo en cuenta que la energía libre escalada de las Ecs. (3.21) y (4.6) difieren únicamente en una constante, las coordenadas del punto silla, n^* y R^* , no se ven modificadas y vienen descritas por las Ecs. (3.32), *i.e.*,

$$R_r^* = \frac{1 + 4\tilde{f}_r(2\tilde{f}_r - \Gamma) - \zeta}{8\tilde{f}_r(\tilde{f}_r - \Gamma)}, \quad n_r^* = \frac{\zeta - 1 + 4\tilde{f}_r[\Gamma + \tilde{f}_r(\zeta - 4\tilde{f}_r\Gamma - 3)]}{8\zeta(\tilde{f}_r - \Gamma)^2}, \quad (3.32)$$

siendo

$$\zeta \equiv \sqrt{1 + 8\tilde{f}_r [2\tilde{f}_r(1 + \Gamma^2) - \Gamma]}. \quad (3.33)$$

Por lo tanto, el único cambio afecta a la altura de la barrera de energía que se ve reducida en comparación con la Ec. (3.34) por una constante $\Delta\mu_m/\lambda_T n_T$. Debido a que el efecto de δ es disminuir tanto ΔG^* ($\Delta\mathcal{E}^*$) como (n_r^*, R_r^*) , se puede inferir que el ritmo de ensamblaje, $J_{\beta_n \gg \beta_R}$, y desensamblaje, $J_{\text{des } \beta_n \gg \beta_R}$, de cápsides virales es más rápido cuando el autoensamblaje ocurre en contacto puntual con un molde esférico, por un factor $\exp(-\beta\Delta\mu_m)$.

4.4 Ensamblaje sobre el Molde Esférico

Considere ahora el caso en que la cápside se ensambla sobre el molde esférico preformado. Cuando las subunidades proteicas forman agregados que siguen la curvatura del molde durante la construcción de la cápside, se cumple que $R = R_m$ para cualquier valor de n en la energía libre escalada, $\Delta\mathcal{E}$. Utilizando las variables adimensionales previamente definidas y estableciendo $R_r = R_{rm}$, la expresión de $\Delta\mathcal{E}$ se reduce a la Ec. (4.7), que se puede reescribir como

$$\Delta\mathcal{E}(n_r) = n_r C_m + \sqrt{n_r \left(1 - \frac{n_r}{R_{rm}^2}\right)}, \quad (4.10)$$

siendo

$$C_m \equiv \tilde{f}_r \left(\frac{1}{R_{rm}} - 1 \right)^2 - \gamma_m \Gamma, \quad (4.11)$$

el *supersaturación efectiva escalada*. Esta supersaturación efectiva presenta dos novedades respecto a Γ : el factor γ_m , que representa la ganancia debido a la energía de adsorción y el término $\tilde{f}_r(1/R_{rm} - 1)^2$, que representa la penalización en forma de energía de flexión por tener que ajustarse a la curvatura del molde. Evidentemente, la situación más favorable es cuando el molde tiene el mismo radio que la curvatura preferencial, *i.e.*, $R_m = R_T$. En ese caso, desaparece la penalización por flexión y se aprovecha al máximo la ventaja energética de ensamblarse sobre el molde.

En la Figura 4.4, se muestra el paisaje de energía generado por la Ec. (4.10) en función de n_r con Γ y $\tilde{f}_r$ fijos, y cómo varía en respuesta a los cambios en γ_m (panel izquierdo) y R_{rm} (panel derecho). En el panel izquierdo de la figura, se observa que al fijar la supersaturación Γ , el factor de escalamiento γ_m disminuye la altura de la barrera de energía y aumenta la estabilidad del estado final de agregación.

En contraste, el valor del radio del molde R_{rm} provoca cambios más drásticos en el ensamblaje. Por un lado, R_{rm} dicta el valor del radio y tamaño de la cápside final cerrada: $n_{rc} = R_{rm}^2$, en donde, nuevamente, el *número de cierre escalado* está dado por $n_{rc} \equiv n_c/n_T$, siendo n_c el *número de cierre*, *i.e.*, el número de subunidades de la cápside completa. A medida que R_{rm} disminuye, se reduce el número de subunidades proteicas en la cápside completamente formada, lo que hace que la línea que representa la energía libre termine a una distancia horizontal más corta desde el origen. Por otro lado, en el panel derecho se puede ver que si el radio del molde es muy distinto del radio preferencial, podría perderse la ventaja en energía de adsorción de ensamblarse sobre el molde, resultando en energías de nucleación y finales de la cápside más altas que en ausencia de molde.

Se observa también que la penalización en la energía libre por ensamblarse con $R_m < R_T$ o con $R_m > R_T$ no es la misma debido a la naturaleza asimétrica de la energía de flexión, descrita por la Ec. (3.3). En otras palabras, desviarse de la curvatura preferencial, en la misma proporción δ_R , hacia radios menores en comparación con R_T no conlleva el mismo costo energético que desviarse hacia radios mayores en relación con R_T .

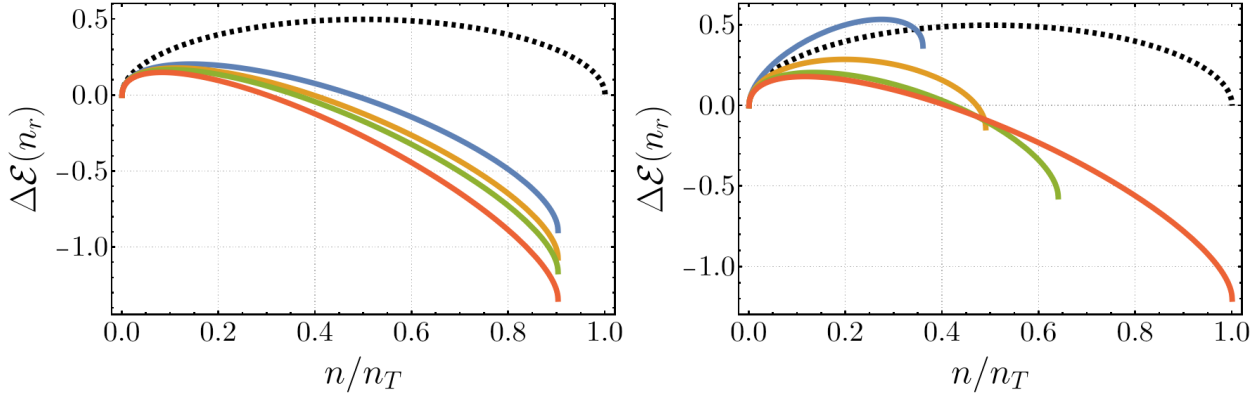


Figura 4.4: Paisaje de energía generado por la Ec. (4.10) en función de $n_r = n/n_T$ para diferentes valores de γ_m (panel izquierdo) y R_{rm} (panel derecho). En el panel izquierdo, se estableció $R_{rm} = 0.95$ y se usaron los siguientes valores de γ_m : $\gamma_m = 1.0$ (línea azul), $\gamma_m = 1.2$ (línea naranja), $\gamma_m = 1.3$ (línea verde), y $\gamma_m = 1.5$ (línea roja). El panel derecho tiene asociado $\gamma_m = 1.2$ y el conjunto de valores subsiguiente de R_{rm} : $R_{rm} = 0.60$ (línea azul), $R_{rm} = 0.70$ (línea naranja), $R_{rm} = 0.80$ (línea verde) y $R_{rm} = 1.00$ (línea roja). Se utilizaron $\Gamma = 1.0$ y $\tilde{f}_r = 5.0$ como valores de supersaturación y constante de flexión para generar las gráficas. En ambos casos, la línea negra discontinua representa el paisaje de energía en equilibrio, *i.e.*, $\Gamma = 0.0$ y con $R_{rm} = 1$, sirviendo como referencia para comprender el efecto del radio del molde en la interacción molde-subunidad.

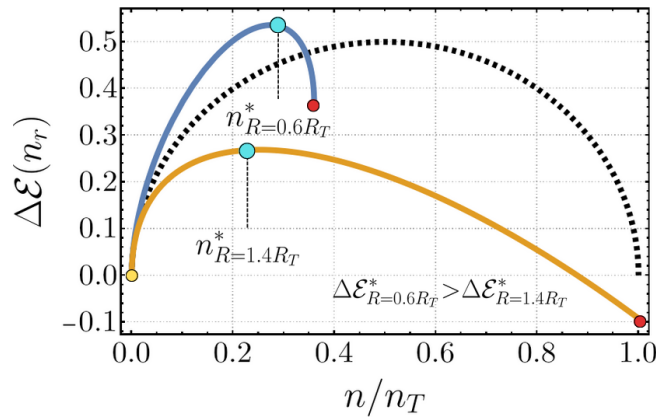


Figura 4.5: Gráficas representativas del paisaje de energía libre escalada, Ec. (4.10), y el efecto que implica ensamblarse sobre un molde con $R_m < R_T$ o $R_m > R_T$, en función del número de subunidades instantáneo escalado, n/n_T . En el gráfico se presentan tres condiciones de autoensamblaje: (i) autoensamblaje en el estado de equilibrio, *i.e.*, con $\Gamma = 0.0$ ($\Delta\mu = 0.0, k_B T$) (línea negra discontinua), (ii) autoensamblaje con $R_m = 0.6R_T$ (línea azul) y (iii) autoensamblaje con $R_m = 1.4R_T$ (línea naranja). La estructura de estas curvas se establece considerando que $\Gamma = 1.0$, $\gamma_m = 1.2$ y $\tilde{f}_r = 5.0$. El inicio y final del autoensamblaje se representan con un punto en color amarillo y rojo, respectivamente.

En la Figura 4.5, las líneas sólidas a color representan el paisaje de energía libre escalada de una cápside que se ensambla sobre un molde con una curvatura menor (línea azul) y mayor (línea naranja) en comparación con R_T . El punto de inicio del autoensamblaje es el mismo para ambos casos (punto en color amarillo). Ambas desviaciones mantienen la misma proporción: el radio del molde que define la curva azul es un 40 % menor que R_T , mientras que la línea naranja representa el ensamblaje de una cápside sobre un molde cuyo radio es un 40 % mayor que R_T . En este ejemplo particular, la diferencia entre las barreras de energía correspondientes y el estado final de autoensamblaje (representado por el punto en color rojo) es evidente. El estado final de autoensamblaje es metaestable cuando $R_m = 0.6R_T$, pero se vuelve estable si $R_m = 1.4R_T$ bajo las mismas condiciones fisicoquímicas, lo que resalta la asimetría energética de la flexión en el modelo. Es notable que la barrera de nucleación es también significativamente diferente, con $\Delta\mathcal{E}_{R=0.6R_T}^* > \Delta\mathcal{E}_{R=1.4R_T}^*$. Además, el tamaño del núcleo crítico, n^* , es mayor cuando el radio del molde es un 40 % menor que R_T en comparación con el caso en que es un 40 % mayor que R_T .

La discusión de los parámetros óptimos γ_m y R_{rm} que tienden a generar una menor barrera energética y un estado final de autoensamblaje estable, se aborda a través de diagramas de fase de autoensamblaje en las Secciones 4.7, 4.8 y 4.9. Específicamente, se analiza la conveniencia de ensamblar a radios mayores o menores en relación con la curvatura preferencial en la Sección 4.10.

4.4.1 Régimen de Estabilidad de una Cápside en Presencia de un Molde Esférico

Al igual que en la Sección 3.3.2 del Capítulo 3, y la Sección 4.3.1, la estabilidad de una cápside completamente formada se puede caracterizar a través del valor de la energía libre escalada, $\Delta\mathcal{E}$ evaluada en el número de cierre escalado, n_{rc} . Si $\Delta\mathcal{E}_c < 0$, la cápside es estable, mientras que si $\Delta\mathcal{E}_c > 0$, la cápside es metaestable.

Evaluando la Ec. (4.10) en $n_r = R_{rm}^2$, la energía libre de cierre resulta

$$\Delta\mathcal{E}_c \equiv \Delta\mathcal{E}(n_r = n_{rc}) = R_{rm}^2 \left[\tilde{f}_r \left(\frac{1}{R_{rm}} - 1 \right)^2 - \gamma_m \Gamma \right]. \quad (4.12)$$

Igualando la ecuación anterior a cero y resolviendo para Γ , se obtiene la SMF, *i.e.*,

$$\Gamma_{\text{front}} = \frac{\tilde{f}_r}{\gamma_m} \left(\frac{1}{R_{rm}} - 1 \right)^2, \quad (4.13)$$

que a su vez separa las regiones estables y metaestables de la formación de cápsides cerradas sobre un molde esférico.

En la Fig. 4.6, se muestran las regiones de estabilidad y metaestabilidad que se obtienen para el AECV que se ensamblan sobre un molde esférico.⁸

⁸Si bien la representación gráfica del régimen de estabilidad de las Figs. 3.7 y 4.6 se ilustra en función de $\tilde{f}_r$, también puede realizarse en términos de cualquier otro parámetro de autoensamblaje disponible, *e.g.*, R_{rm} (ver la Fig. 4.10), γ_m , e incluso términos de la desviación relativa de curvatura, δ_R (véase la Sección 4.10).

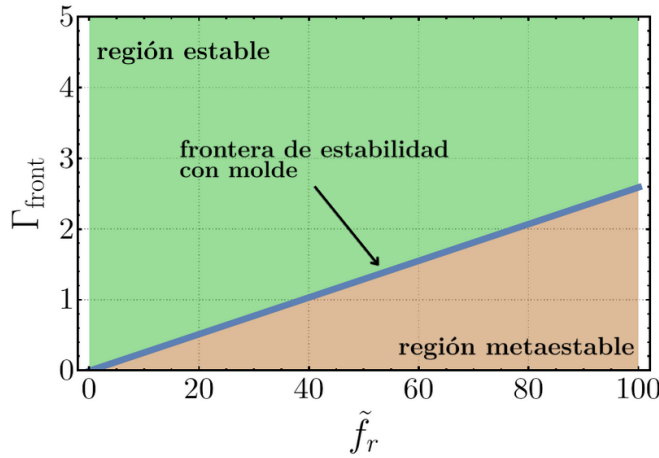


Figura 4.6: Régimen de estabilidad de cápsides virales cerradas que se han autoensamblado sobre un molde esférico. La región verde muestra cápsides estables, mientras que la región roja representa cápsides metaestables. Dentro de la región estable, cualquier combinación de los parámetros Γ y $\tilde{f}_r$ garantiza la formación de una cápside con energía libre (escalada) menor a cero. Por otro lado, la elección de una combinación de parámetros en la región roja puede llevar a una cápside metaestable. La línea azul en el diagrama representa la frontera de estabilidad, determinada por la Ec. (4.13). Los valores utilizados para generar el diagrama de estabilidad fueron $R_{rm} = 0.85$ y $\gamma_m = 1.2$.

Finalmente, como un análogo de la Ec. (3.29), y haciendo uso de las Ecs. (2.66), (4.5) y (4.13), se encuentra la expresión que define la cota superior de la diferencia de potencial químico, $\Delta\mu_{\text{cotsup}}$, que garantiza la formación de una cápside estable. Esto es,

$$\Delta\mu_{\text{cotsup}} \equiv \frac{\pi\Delta g\tilde{f}_r}{2\gamma_m\sqrt{n_T}} \left(\frac{1}{R_{rm}} - 1 \right)^2. \quad (4.14)$$

4.4.2 Efectos en la Barrera de Energía y el Tamaño Crítico de Nucleación

Utilizando la Ec. (4.11) para mantener una notación simple, se calcula fácilmente la altura de la barrera de energía tamaño crítico del núcleo, ambos en su versión escalada. Al derivar la Ec. (4.10) respecto a n_r y posteriormente evaluar en $n_r = n_r^*$ se obtiene

$$\left(\frac{\partial\Delta\mathcal{E}(n_r)}{\partial n_r} \right)_{n_r=n_r^*} = C_m + \frac{1}{2R_{rm}} \left(\sqrt{\frac{R_{rm}^2 - n_r^*}{n_r^*}} - \sqrt{\frac{n_r^*}{R_{rm}^2 - n_r^*}} \right). \quad (4.15)$$

Igualando esta derivada a cero y resolviendo para n_r^* , se determina el tamaño crítico escalado de este sistema, a saber,

$$n_r^* = \frac{1}{2} \left(R_{rm}^2 + \frac{C_m R_{rm}^3}{\sqrt{1 + C_m^2 R_{rm}^2}} \right). \quad (4.16)$$

Sustituyendo la ecuación anterior en la Ec. (4.10) se encuentra que la altura de la barrera de energía escalada, en términos de C_m y R_{rm} , es

$$\Delta\mathcal{E}^* \equiv \Delta\mathcal{E}(n_r^*) = \frac{1}{2} \left[\sqrt{\frac{R_{rm}^2}{1 + C_m^2 R_{rm}^2}} + C_m R_{rm}^2 \left(1 + \frac{C_m R_{rm}}{\sqrt{1 + C_m^2 R_{rm}^2}} \right) \right]. \quad (4.17)$$

La Figura 4.7 muestra el comportamiento característico de las Ecs. (4.16) y (4.17) en función de la supersaturación, Γ , para distintos valores de γ_m a R_{rm} fijo. En el panel izquierdo de este gráfico, se

puede observar que el cociente R_m/R_T define el tamaño crítico en equilibrio ($\Gamma = 0.0$), mientras que γ_m establece el ritmo de decaimiento de dicho tamaño a medida que Γ crece. Un comportamiento similar ocurre en el panel derecho, pero en términos de la altura de la barrera de energía. Estos resultados confirman que la energía de adsorción debida a presencia de un andamio de tamaño similar al preferencial reduce el tamaño crítico requerido para la formación de la cápside y hace que el proceso de ensamblaje sea más favorable [44, 149].

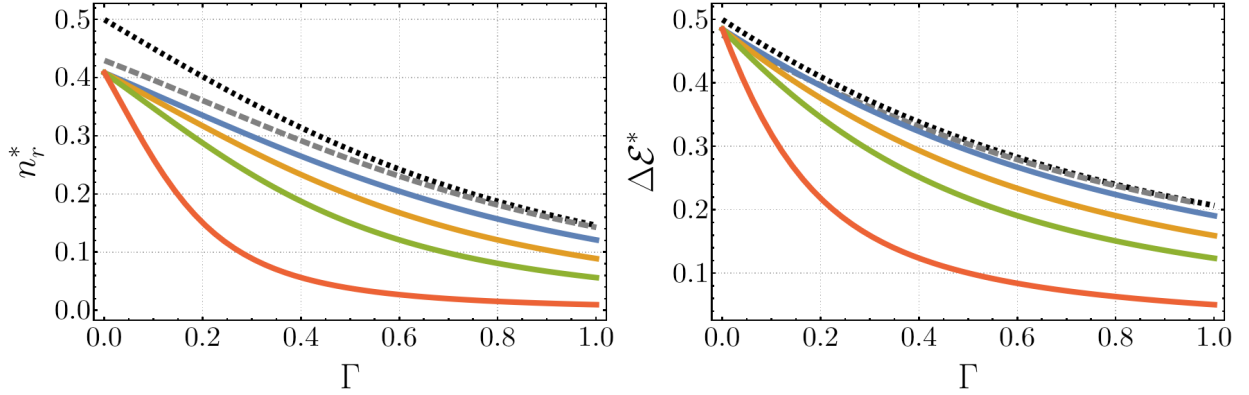


Figura 4.7: Tamaño crítico escalado y altura de la barrera de energía escalada en función de la supersaturación, Γ , para distintos valores del factor de escalamiento, γ_m . En el panel izquierdo, se representa la variación del tamaño crítico relativo a n_T , Ec. (4.16). En el panel derecho, se encuentra el comportamiento de ΔE^* según la Ec. (4.17). Las curvas en color se generaron con los siguientes valores $\tilde{f}_r = 5.0$ y $R_{rm} = 0.85$, en donde $\gamma_m = 1.2$ (línea azul), $\gamma_m = 1.5$ (línea naranja), $\gamma_m = 2.0$ (línea verde) y $\gamma_m = 5.0$ (línea roja). En ambos paneles se representa el comportamiento de las cantidades correspondientes en el «modelo clásico» (línea negra discontinua) y en el modelo de AECV con energía de flexión (línea gris discontinua).

La Figura 4.8 presenta gráficamente las Ecs. (4.16) y (4.17) en función del tamaño del molde, R_{rm} , al fijar Γ y variar la intensidad de la interacción molde-subunidad a través de γ_m . Es conveniente explicar por separado los elementos de la gráfica y el comportamiento de las curvas en cada panel. Primero se abordará el panel izquierdo y luego el panel derecho.

En el panel izquierdo de la Fig. 4.8, la línea negra discontinua representa el «modelo clásico» del Capítulo 2 en condiciones de equilibrio, es decir, con $\Gamma = 0.0$, donde se tiene que $n_r^* = R_{rm}^2/2$, correspondiente a recubrir la mitad del molde. La línea negra discontinua incluye, por supuesto, el punto con coordenadas $(R_{rm} = 1.0, n_r^* = 0.5)$.

Las curvas a color del panel izquierdo de la Fig. 4.8 corresponden a $\Gamma = 1.0$. Su comportamiento se puede explicar como sigue. Cuando el radio del molde coincide con el radio preferencial, $R_{rm} = 1$, se observa que el tamaño crítico cumple con que $n_r^* < 0.5$, debido al incremento de la supersaturación efectiva, que a su vez se origina por la presencia de la energía de adsorción con el molde. Conforme el radio del molde aumenta o disminuye alejándose del valor preferencial, el coste de energía de flexión aumenta, por lo que se requiere un núcleo de mayor tamaño. El tamaño del núcleo crece a medida que disminuye R_{rm} hasta llegar a un valor máximo $R_{rm}^2/2$, a partir del cual se pierde la ventaja energética de ensamblarse sobre el molde y se obtendrían cápsides cerradas metaestables. Posteriormente, n_r^* alcanza un máximo, donde el tamaño del molde produce una penalización energética de flexión máxima en la energía libre de autoensamblaje. Luego, el tamaño del núcleo comienza a disminuir, lo que indica que, aunque la energía de flexión aumenta con moldes más pequeños, el reducido tamaño del molde hace que se necesiten menos subunidades para formar el

tamaño crítico. Por último, si el tamaño del molde es cercano a cero, una subunidad proteica podría ser suficiente para formar un núcleo. Esto se observa en el extremo izquierdo de esta gráfica.

En el panel derecho de la Fig. 4.8, que representa la altura de la barrera de nucleación, $\Delta\mathcal{E}^*$, en función de R_{rm} . Las curvas a color muestran caso $\Gamma = 1.0$ para diferentes valores de γ_m . En todos los casos, la barrera de nucleación es menor que en el modelo clásico. Las desviaciones de curvatura respecto al valor preferencial incrementan la altura de la barrera de energía, pero a un ritmo más lento para radios $R_{rm} > R_T$, en comparación con las desviaciones a radios menores.

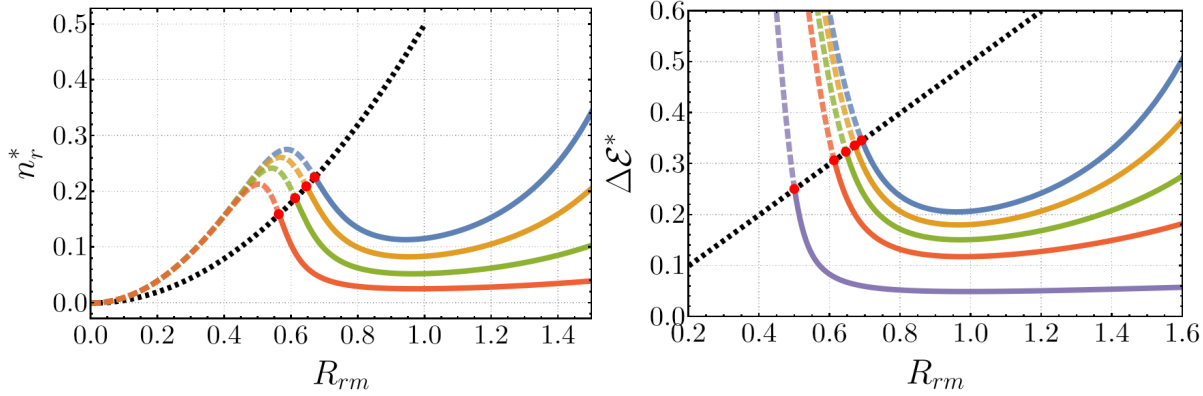


Figura 4.8: Tamaño crítico escalado y altura de la barrera de energía escalada en función del radio del molde escalado, $R_{rm} = R_m/R_T$, para distintos valores del factor de escalamiento, γ_m . En el panel izquierdo, se representa la variación del tamaño crítico del núcleo relativo a n_T , Ec. (4.16). En el panel derecho, se encuentra el comportamiento de $\Delta\mathcal{E}^*$ según la Ec. (4.17). Las curvas en color se generaron con los siguientes valores: $\Gamma = 1.0$ y $\tilde{f}_r = 5.0$, en donde $\gamma_m = 1.2$ (línea azul), $\gamma_m = 1.5$ (línea naranja), $\gamma_m = 2.0$ (línea verde) y $\gamma_m = 5.0$ (línea roja). En ambos paneles se representa el comportamiento de las cantidades cuando $\Gamma = 0.0$ a la vez que $\tilde{f}_r = 0.0$, que marca el límite de estabilidad de las cápsides cerradas (línea negra discontinua).

La Fig. 4.9 representa el comportamiento gráfico del tamaño del núcleo crítico escalado y de la altura de la barrera de energía escalada en el caso dominado por la energía de flexión. Esto ocurre para valores muy grandes de $\tilde{f}_r$, donde el costo energético asociado a las desviaciones de la curvatura preferencial no es compensado por el efecto combinado de la supersaturación y el factor de escalamiento. En este caso, tanto n_r^* como $\Delta\mathcal{E}^*$ tienen un mínimo muy pronunciado en $R_{rm} = 1.0$, lo que indica que el mínimo global del tamaño del núcleo crítico y de la barrera de energía ocurre cuando el radio del molde coincide con el radio de la curvatura preferencial. Esto era de esperarse, ya que en ese caso la energía de flexión de la Ec. (4.10) es cero.

Aunque se puede calcular n_r^* y $\Delta\mathcal{E}^*$ para un dominio muy grande de R_{rm} , no todos los valores obtenidos producirán cápsides estables. Una vez que se han fijado $\tilde{f}_r$ y γ_m , se puede encontrar el régimen de estabilidad de Γ_{front} en función de R_{rm} , como se muestra en la Fig. 4.10. En las Figs. 4.8 y 4.9, la sección continua de las curvas a color representa el dominio y rango de valores que garantizan la formación de cápsides estables. Por otro lado, las curvas discontinuas a color representan las regiones que conducen a la metaestabilidad de una cápside cerrada. Los puntos en color rojo indicados en las gráficas muestran la *transición estable-metaestable* de las cápsides virales.

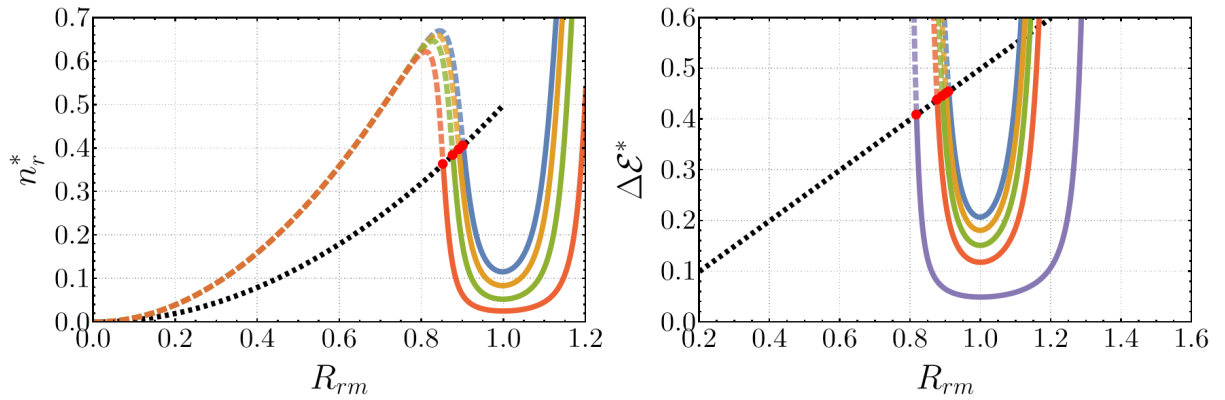


Figura 4.9: Tamaño crítico escalado y altura de la barrera de energía escalada en función $R_{rm} = R_m/R_T$, para distintos valores del factor de escalamiento, γ_m , en el caso dominado por la energía de flexión, *i.e.*, $\tilde{f}_r \rightarrow \infty$. En el panel izquierdo, se representa la variación del tamaño crítico del núcleo relativo a n_T , Ec. (4.16). En el panel derecho, se muestra el comportamiento de $\Delta\epsilon^*$ de acuerdo con la Ec. (4.17). Las curvas en color se generaron con los siguientes valores $\Gamma = 1.0$ y $\tilde{f}_r = 1000$, en donde $\gamma_m = 1.2$ (línea azul), $\gamma_m = 1.5$ (línea naranja), $\gamma_m = 2.0$ (línea verde) y $\gamma_m = 5.0$ (línea roja). En ambos paneles se representa el comportamiento de las cantidades cuando $\Gamma = 0.0$.

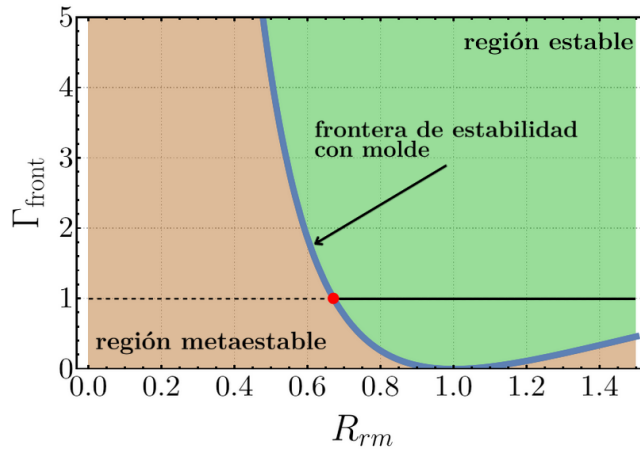


Figura 4.10: Régimen de estabilidad de cápsides virales cerradas que se ensamblan sobre un molde esférico. En verde se muestra la región de cápsides estables y en roja la región de cápsides metaestables. Dentro de la región estable, cualquier combinación de los parámetros Γ y $\tilde{f}_r$ garantiza la formación de una cápside que tendrá una energía libre (escalada) menor a cero. Por otro lado, la elección de una combinación de parámetros de la región en color roja producirá una cápside metaestable. Adicionalmente, la línea azul representa la frontera de estabilidad, determinada por la Ec. (4.13). Los valores utilizados para generar el diagrama de estabilidad fueron $\tilde{f}_r = 5.0$ y $\gamma_m = 1.2$. Con un punto en color rojo se señala el valor de R_{rm} que separa los regímenes estable y metaestable cuando $\Gamma = 1.0$, en este caso $R_{rm} \approx 0.67$, por lo que la estabilidad se consigue para $R_{rm} > 0.67$ en este caso.

Es interesante resaltar que con el modelo presentado en este capítulo es posible determinar los tamaños críticos y la altura de la barrera de energía en términos de Γ , $\tilde{f}_r$ y γ_m , que a su vez se relacionan con cantidades fundamentales accesibles experimental o computacionalmente. Estas cantidades tienen el potencial de proporcionar predicciones de la estructura final de las cápsides en ciertas condiciones fisicoquímicas mediante métodos analíticos.

Previo a la discusión de los *diagramas de fase de autoensamblaje*, resulta ilustrativo analizar la cinética del AECV cuando se ensamblan sobre un molde preformado. La cinética y el ritmo de nucleación de cápsides virales en estas condiciones se discuten en la siguiente sección.

4.5 Cinética de Autoensamblaje y Ritmo de Nucleación en Presencia de un Molde Esférico

Antes de estimar el ritmo de nucleación en el estado estacionario asociado al sistema en cuestión, es crucial reconocer que, al autoensamblarse las subunidades proteicas sobre el molde, la energía libre de autoensamblaje solo tiene un grado de libertad, *i.e.*, n_r (ver Ec. (4.10)). Por lo tanto, se pueden aplicar las mismas consideraciones teóricas de la Sección 2.4, para modelar la cinética de nucleación en este caso. Siguiendo estos argumentos, se puede deducir que el ritmo de nucleación de este sistema se expresa mediante la Ec. (2.113), es decir,

$$J = c_s \beta_n^* Z \exp(-\beta \Delta G^*), \quad (2.113)$$

siendo c_s la concentración del solvente, β_n^* el ritmo de unión de subunidades proteicas en la vecindad del punto crítico n^* , Z el factor de Zeldovich, que se determina como se muestra a continuación:

$$Z = \sqrt{\frac{W^*}{2\pi k_B T}}, \quad (2.114)$$

y W^* el negativo de la segunda derivada de la energía libre, Ec. (4.10), evaluada en el tamaño crítico del núcleo, es decir, evaluada en $n = n^*$, a saber,

$$W^* \equiv -\left(\frac{\partial^2 \Delta G(n)}{\partial n^2}\right)_{n=n^*} < 0. \quad (2.110)$$

La expresión resultante del ritmo de nucleación en el estado estacionario de una cápside que se ensambla sobre un molde preformado es, aunque analítica, muy complicada de escribir. Sin embargo, el análisis gráfico de este resultado proporciona información crucial sobre la producción de los núcleos de cápsides virales.

En la Figura 4.11, se muestra el ritmo de nucleación normalizado por el valor para $\Gamma = 0.0$ y $R_{rm} = 1.0$, J/J_0 , en el estado estacionario en función de Γ (panel izquierdo), y el cociente J/J_0 en función del tamaño del molde R_{rm} (panel derecho).

En el panel izquierdo de dicha figura, se muestra que el factor de escalamiento incrementa la afinidad efectiva de las subunidades para estar en un estado de agregación, lo que físicamente implica un aumento en el ritmo de nucleación. Por otro lado, en el panel derecho, se observa la presencia de un máximo, el cual siempre ocurre en el dominio de desviaciones de curvatura pequeñas (aproximadamente dentro del 20 % respecto a R_T en estas condiciones de autoensamblaje). Este máximo está determinado por la constante de flexión, $\tilde{f}_r$, asociada a la cápside. En el caso dominado por la energía de flexión, el máximo de las curvas del ritmo de nucleación se encuentra en $R_{rm} = 1$.

Por otro lado, si la cápside es menos rígida, el máximo se desplaza hacia la izquierda, porque un menor radio del molde implica que el tamaño crítico y su energía de borde correspondiente sea menor. La representación del ritmo de nucleación en el modelo clásico se muestra con una línea negra discontinua, lo que facilita la identificación de las zonas donde se formarán núcleos de cápsides más rápidamente y las condiciones que favorecen este proceso.

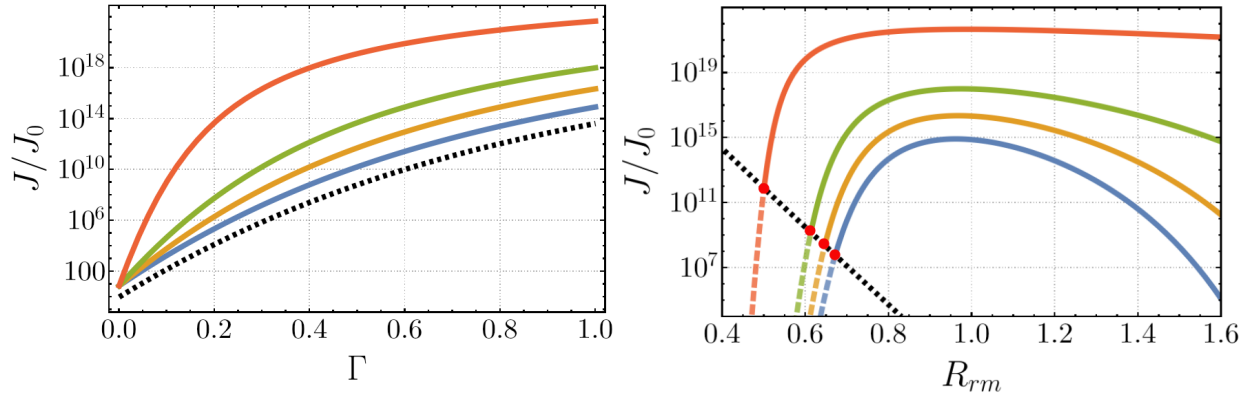


Figura 4.11: Ritmo de autoensamblaje en el estado estacionario.[†] En el panel izquierdo, se grafica el ritmo de nucleación, Ec. (2.113) (escalado por J_0 , siendo J_0 el ritmo de nucleación evaluado en $\Gamma = 0.0$ $R_{rm} = 1.0$) en función de la supersaturación, Γ , en donde se estableció que $R_{rm} = 0.95$ para fijar el valor del costo de energía de flexión. En esta gráfica, se representa la solución del modelo clásico del Capítulo 2 con una línea negra discontinua. En el panel derecho, se grafica el cociente J/J_0 en función de R_{rm} , usando $\Gamma = 1.0$. Los puntos en color rojo indican la frontera de estabilidad en el eje de las abscisas, por lo que la sección de las curvas a color que se encuentren a la izquierda de los puntos en color rojo generan cápsides metaestables (líneas discontinuas) y la sección a la derecha de estos puntos muestran la región estable (líneas continuas). En ambas gráficas, los valores utilizados para generar las curvas fueron $\tilde{f}_r = 5.0$, $n_c = 180^*$, $\Delta g \approx -5k_B T$, y una serie de valores para γ_m : $\gamma_m = 1.2$ (línea azul), $\gamma_m = 1.5$ (línea naranja), $\gamma_m = 2.0$ (línea verde) y $\gamma_m = 5.0$ (línea roja).

[†] Con el fin de dar una representación e interpretación adecuada del ritmo de autoensamblaje, las gráficas generadas para esta figura se obtuvieron utilizando la energía libre de Gibbs, ΔG , y el tamaño crítico, n^* , en su versión *dimensional* en vez de sus versiones adimensionales que son la energía libre escalada, Ec. (4.2) y el cociente n^*/n_T de la Ec. (4.16). Las versiones dimensionales se obtienen a través de las siguientes relaciones: $n^* = n_r^* n_T$ y $\Delta G^* = \lambda_T n_T \Delta \mathcal{E}^*$, respectivamente, lo que justifica la necesidad de escribir λ_T de forma explícita (ver Ec. (3.19)) y, por lo tanto, proporcionar una aproximación de la energía de enlace efectiva por subunidad Δg y el número de subunidades en una cápside completamente formada que sigue la curvatura preferencial R_T , *i.e.*, n_T . La discusión de los casos en los que es conveniente utilizar las cantidades escaladas y cuando no se encuentra en el pie de página de la página 75.

*Es importante no confundir el número de cierre, n_c , con el *número de agregación preferencial*, n_T . El número de cierre se determina por completo al fijar R_{rm} y no es necesario indicarlo explícitamente, mientras que n_T influye en la estimación de λ_T y proporciona información sobre la curvatura preferencial.

Al igual que en las Figs. 4.8 y 4.9, se encuentra que existe una combinación de parámetros que conducen a la formación de cápsides metaestables. La región discontinua de las curvas a color del panel derecho de la Fig. 4.11 indica el valor de J/J_0 , para esos valores de Γ , $\tilde{f}_r$ y γ_m , asociado a la producción de núcleos de cápsides metaestables. Los puntos en color rojo están ubicados en los valores de R_{rm} que definen la frontera de estabilidad para esas condiciones de autoensamblaje (consultar Fig. 4.10).

Una de las cuestiones más importantes a determinar es bajo qué condiciones resulta más favorable ensamblarse sobre el molde frente a ensamblarse sin él. En las siguientes secciones, se introducen los diagramas de fase de autoensamblaje en el contexto de la Teoría Clásica de Nucleación de Cápsides Virales (TCNCV). Posteriormente, en las Secciones 4.7, 4.8 y 4.9 se discuten los diagramas de fase generados con distintos discriminantes o identificadores de fase en función de R_{rm} y γ_m .

4.6 Sobre los Diagramas de Fase de Autoensamblaje de Cápsides Virales

El término *diagrama de fase de autoensamblaje* se introduce en esta tesis para referirse a una representación gráfica que ilustra cuál es estado más favorable en función de distintos *criterios energéticos* y de los parámetros que controlan el autoensamblaje Γ , $\tilde{f}_r$, R_{rm} y γ_m .

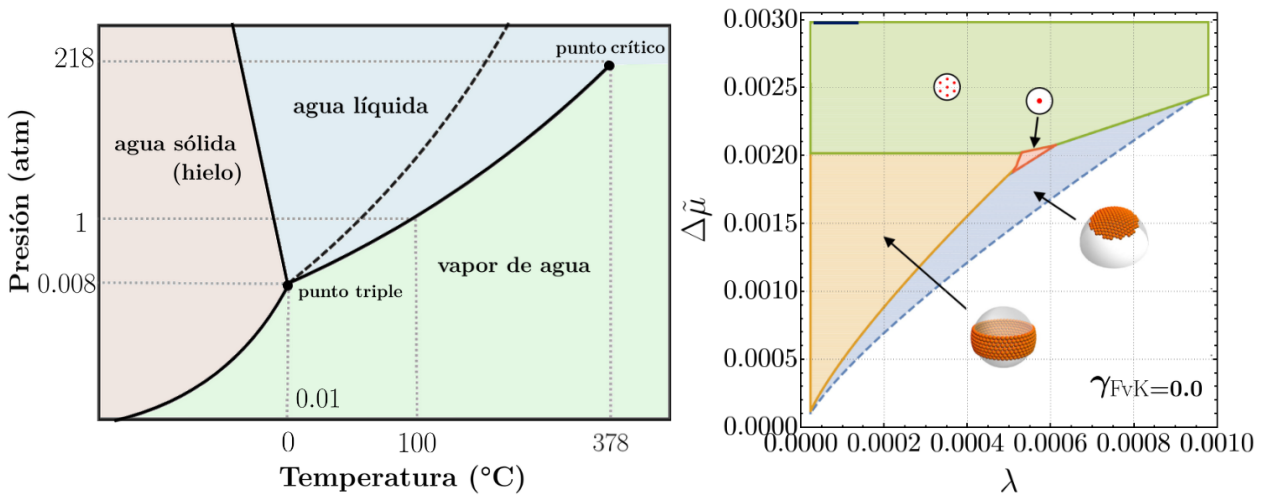


Figura 4.12: Diagrama de fase del agua y diagrama de autoensamblaje cápsides virales. En el panel izquierdo, se presenta una versión simplificada del diagrama de fase temperatura-presión del agua, en donde los estados sólido, líquido y gaseoso del agua se muestran como función de la presión, p , y la temperatura, T . Las líneas continuas representan la coexistencia de distintas fases en el equilibrio (equilibrio en términos del potencial químico entre las fases α y β , *i.e.*, $\mu_\alpha = \mu_\beta$). Adicionalmente se identifican dos puntos singulares: (i) el *punto triple*, que ocurre a $T = 0.01^\circ\text{C}$ y $p = 0.008$ atm, y en donde las tres fases coexisten y (ii) el *punto crítico* con coordenadas ($T = 378^\circ\text{C}$, $p = 218$ atm), que señala el término de la coexistencia líquido-vapor. En el panel derecho, se muestra uno de los diagramas de fase de autoensamblaje generados por C. Mendoza y D. Reguera (figura adaptada de [43]) en el caso dominado por la energía de flexión, *i.e.*, $\gamma_{FvK} = 0.0$ ($\tilde{f}_r \rightarrow \infty$): Las diferentes fases indican cuál es la estructura con la energía libre más baja en términos sus parámetros λ y $\Delta\tilde{\mu}$. En color naranja se destacan los cinturones como estructuras más estables, en rojo las cápsides frustradas con defectos, en verde los cascarones cerrados sin defectos, y en morado los cilindros. Además, se muestra en azul una región correspondiente a casquetes esféricos metaestables sin defectos, mientras que la región blanca representa subunidades proteicas libres en solución.

El término «*fases energéticas*» se utiliza para distinguir entre diferentes fases en función de los valores obtenidos para la altura de la barrera de energía escalada, $\Delta\mathcal{E}^*$, la energía libre escalada en el estado final de autoensamblaje, $\Delta\mathcal{E}_c$, o ambas. En estos diagramas, una fase se caracteriza por tener una barrera de energía o una energía libre en el estado final de autoensamblaje por

encima o por debajo de un umbral específico. Este término se emplea de manera análoga a los diagramas de fase tradicionales, donde una fase se refiere al estado físico observable de un material que es químicamente uniforme bajo ciertas condiciones de presión, temperatura, volumen y otras variables de estado [73, 74] (ver panel izquierdo de la Fig. 4.12). Las *fronteras o límites de fase* en los diagramas de autoensamblaje son líneas que definen las condiciones de equilibrio entre múltiples fases. Además, bajo determinadas condiciones, pueden aparecer puntos de coexistencia entre dos o más fases, representando los puntos donde dos sistemas de autoensamblaje distintos o en diferentes condiciones coinciden en los valores de $\Delta\mathcal{E}^*$ y $\Delta\mathcal{E}_c$.

El estudio del diagrama de AECV desde la perspectiva de una teoría física es fundamental para comprender los mecanismos que rigen este proceso. Dentro de este marco, es posible (i) identificar parámetros clave, (ii) predecir condiciones de ensamblaje y (iii) obtener información para desarrollar modelos más complejos que describan mejor el proceso real.

En una investigación reciente, C. Mendoza y D. Reguera discuten los diagramas de fase de autoensamblaje para analizar la estabilidad de las estructuras formadas por subunidades proteicas. Este análisis se realiza en términos de un potencial químico escalado, $\Delta\tilde{\mu}$, un término asociado a la tensión lineal, λ , y el número de Föppl-von Kármán (FvK) γ_{FvK} (ver panel derecho de la Figura 4.12). Los diagramas de fases resultaron útiles para predecir y comprender la estabilidad y formación de diversas estructuras, como cintas, cápsides frustradas con defectos, cascarones cerrados con defectos, cilindros y casquetes esféricos metaestables sin defectos [43]. Sin embargo, su investigación se centró únicamente en determinar la estructura con la menor energía libre en el estado final de agregación, sin clasificar las fases según la altura de la barrera energética. Además, no se consideró el efecto dual de la altura de la barrera energética y la energía libre final en los modelos propuestos, y tampoco se incorporó un molde preformado en el proceso de autoensamblaje.

En este capítulo se generan y discuten tres tipos de diagramas de fase de autoensamblaje, cada uno basado en diferentes criterios energéticos para distinguir entre fases. En la siguiente sección se generan y discuten diagramas de fase de autoensamblaje utilizando el criterio energético de la estabilidad de una cápside completa.

4.7 Diagrama de Fase en términos del Estado Final de Autoensamblaje

Cuando una cápside se ha cerrado, la penalización energética asociada con la tensión lineal desaparece, ya que el borde del agregado no está presente. Esto resulta en la conservación de solo dos términos en la energía libre escalada de autoensamblaje: (i) el término relacionado con la ventaja energética de la agregación y (ii) el término asociado con la penalización energética de la flexión. Por lo tanto, de acuerdo con las Ec. (4.7) y (4.12), la energía libre escalada de cierre de una cápside que se ensambla sobre un molde esférico es

$$\Delta\mathcal{E}_{cm} \equiv R_{rm}^2 \left[\tilde{f}_r \left(\frac{1}{R_{rm}} - 1 \right)^2 - \gamma_m \Gamma \right]. \quad (4.12)$$

Por otro lado, la energía libre escalada de una cápside ensamblada sin molde está dada por la Ec. (3.27), *i.e.*,

$$\Delta\mathcal{E}_c = \left[\tilde{f}_r \left(\frac{1}{R_{rc}} - 1 \right)^2 - \Gamma \right] n_{rc}, \quad (3.27)$$

siendo R_{rc} el radio de cierre escalado, el cuál está determinado por la Ec. (3.25), es decir,

$$R_{rc} = \frac{2\sqrt{2}\tilde{f}_r}{\left(2^{1/3} + 2\tilde{f}_r^{2/3}\right)^{3/2}}. \quad (3.25)$$

Comparando ambas energías, Ecs. (4.12) y (3.27), es posible determinar bajo que condiciones es más favorable ensamblarse sobre el molde frente hacerlo directamente sin él.

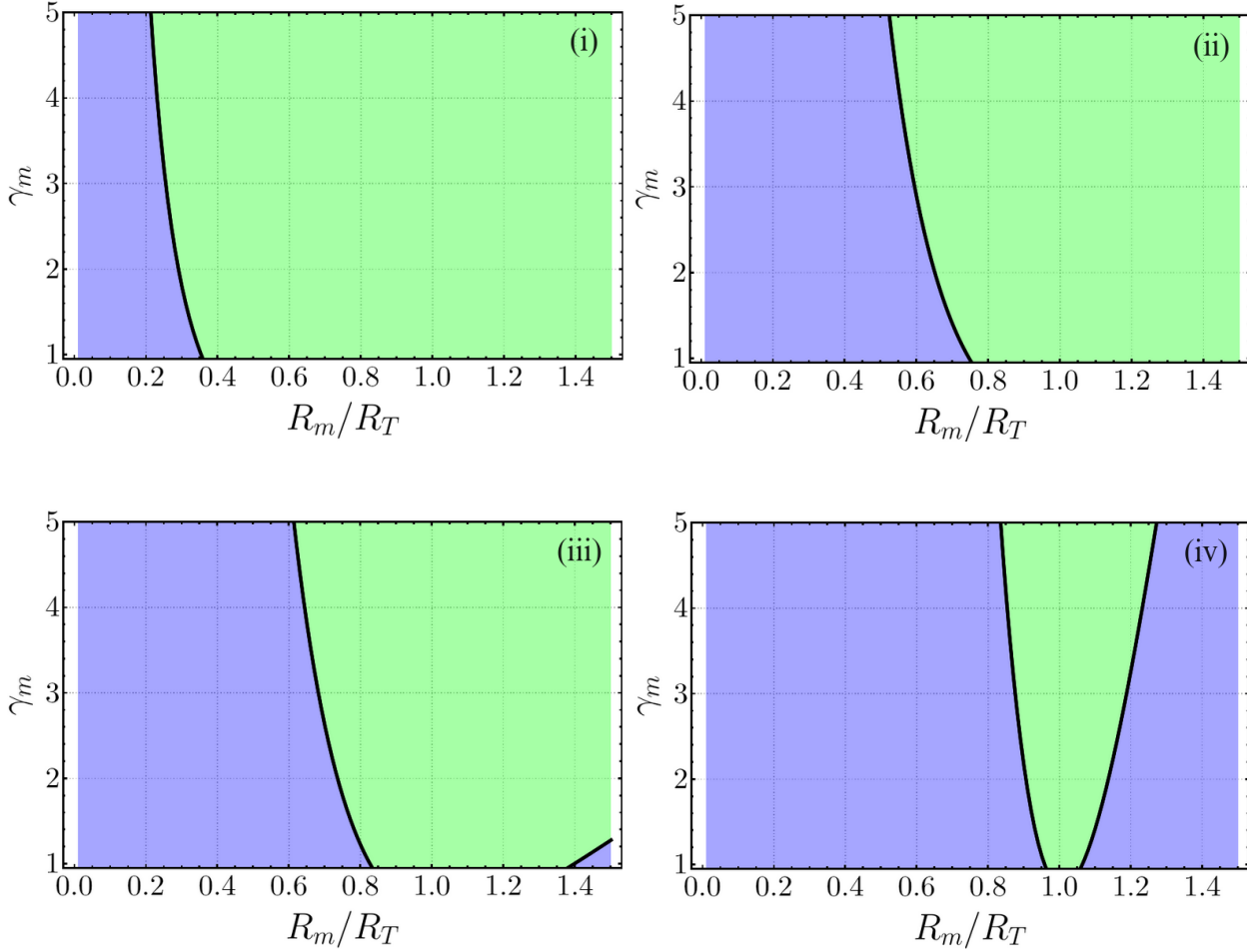


Figura 4.13: Diagrama de fase de autoensamblaje determinado por el criterio energético de la energía libre escalada de cierre. En este diagrama se muestran dos regiones que se categorizan según el valor relativo de la energía libre escalada de cierre, es decir, a través de las desigualdades $\Delta\mathcal{E}_{cm} > \Delta\mathcal{E}_c$ (región azul) y $\Delta\mathcal{E}_{cm} < \Delta\mathcal{E}_c$ (región verde). Los diagramas de fase fueron obtenidos con un valor fijo de la supersaturación, *i.e.*, $\Gamma = 1.0$ y para distintos valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$: $\tilde{f}_r = 0.5$ (cuadrante (i)), $\tilde{f}_r = 5.0$ (cuadrante (ii)), $\tilde{f}_r = 10.0$ (cuadrante (iii)) y $\tilde{f}_r = 100.0$ (cuadrante (iv)).

En la Figura 4.13, se presenta cuál de los escenarios es más favorable en términos de la energía libre del cápside final, en función de γ_m y R_{rm} . En este diagrama se distinguen dos regiones: una donde el autoensamblaje sin molde es más favorable, identificada en color azul y físicamente accesible cuando la energía libre escalada de cierre resultante de ensamblar una cápside sin molde es menor que $\Delta\mathcal{E}_{cm}$. La otra región se define como aquella en la que la energía libre escalada de cierre es menor cuando la cápside se ensambla sobre el molde (que ha sido definida como $\Delta\mathcal{E}_{cm}$ en la Ec.

(4.12) para simplificar la notación y evitar confusiones). En resumen, se busca determinar cómo se consigue la cápside más estable, si formándose a un radio diferente al del molde o sobre este.

La Figura 4.13, muestra que para desviaciones significativas respecto a la curvatura preferencial, ya sea $R_{rm} < R_T$ o $R_{rm} > R_T$, y con valores bajos del factor de escalamiento, γ_m , la cápside resulta más estable cuando se autoensambla fuera del radio del molde (región en color azul). Sin embargo, si el costo energético asociado con la desviación de curvatura es ampliamente compensado por γ_m , la cápside será más estable al ensamblarse sobre el molde (región en color verde). En todos los paneles, para que las subunidades se ensamblen sobre el molde se requiere que $\gamma_m > 1$, es decir que haya una interacción atractiva de adsorción que aumente de manera efectiva la supersaturación. Un valor de $\gamma_m < 1$ equivale a la existencia de una repulsión efectiva entre el molde y las subunidades que evitaría ensamblarse sobre el molde. Sin embargo, la energía final de la cápside cerrada no es lo que determina cómo se autoensambla. Si esto fuera así, la cápside siempre adoptaría el radio final preferencial, $R_r = 1$, ya que se elimina el coste de flexión. Lo que determina el producto final del ensamblaje es el paisaje de energía y los aspectos cinéticos. Por esta razón, conviene analizar el diagrama de fase en términos de la altura de la barrera de nucleación como se hace en la siguiente sección.

4.8 Diagrama de Fase de Autoensamblaje en términos de la Cinética

En esta sección, se estudia el efecto que tienen el factor de escalamiento, γ_m , y el tamaño escalado del molde, R_{rm} , en la altura de la barrera de energía escalada. Para esto, se construye un diagrama de fase describiendo cuál vía de autoensamblaje implica una menor barrera energética: si aquella en la que una cápside se ensambla sin molde o sobre el molde. Naturalmente, en el caso del autoensamblaje sin molde, la altura de la barrera de nucleación está definida matemáticamente por la Ec. (3.34), a saber,

$$\begin{aligned} \Delta\mathcal{E}^* &\equiv \Delta\mathcal{E}(n_r^*, R_r^*) \\ &= \frac{\zeta - 1 - 4\tilde{f}_r\Gamma(\zeta - 4\tilde{f}_r\Gamma) + 2\sqrt{\zeta - (1 - 4\tilde{f}_r\Gamma)}\sqrt{\zeta - 1 + 4\tilde{f}_r[\tilde{f}_r(\zeta - 4\tilde{f}_r\Gamma - 3) + \Gamma]}}{8\zeta(\tilde{f}_r - \Gamma)}. \end{aligned} \quad (3.34)$$

Para el caso en el que la cápside se ensambla sobre un molde esférico, la barrera energética energética escalada está dada por

$$\Delta\mathcal{E}_m^* \equiv \frac{1}{2} \left[\sqrt{\frac{R_{rm}^2}{1 + \mathcal{C}_m^2 R_{rm}^2}} + \mathcal{C}_m R_{rm}^2 \left(1 + \frac{\mathcal{C}_m R_{rm}}{\sqrt{1 + \mathcal{C}_m^2 R_{rm}^2}} \right) \right]. \quad (4.17)$$

Cuando $\Delta\mathcal{E}_m^* > \Delta\mathcal{E}^*$, resulta cinéticamente más rápido ensamblarse fuera del molde y la región será de color azul; mientras que si $\Delta\mathcal{E}_m^* < \Delta\mathcal{E}^*$, resulta más favorable ensamblarse sobre el molde y la región será de color verde.

En la Figura 4.14, se presenta el diagrama de fase de autoensamblaje con el criterio energético de la altura de la barrera de energía escalada en función de γ_m y R_{rm} para distintos valores de la constante de flexión y a supersaturación fija.

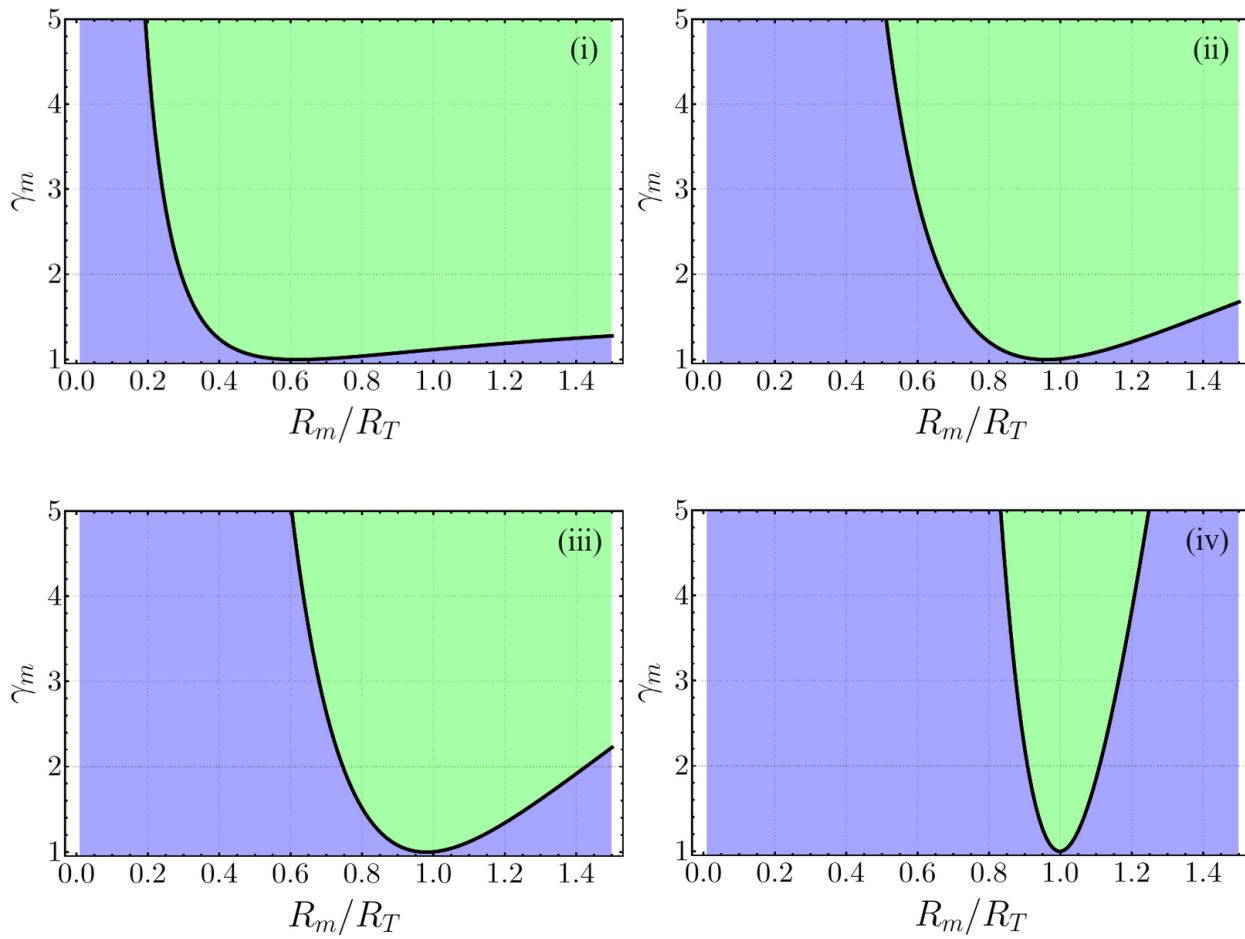


Figura 4.14: Diagrama de fase de autoensamblaje determinado por el criterio energético de la altura de la barrera de energía escalada. Las dos fases se categorizan según los siguientes escenarios: si $\Delta\mathcal{E}_m^* > \Delta\mathcal{E}^*$ (región azul) y $\Delta\mathcal{E}_m^* < \Delta\mathcal{E}^*$ (región verde). Los diagramas de fase fueron obtenidos con un valor fijo de la supersaturación, *i.e.*, $\Gamma = 1.0$, y para distintos valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$: $\tilde{f}_r = 0.5$ (cuadrante (i)), $\tilde{f}_r = 5.0$ (cuadrante (ii)), $\tilde{f}_r = 10.0$ (cuadrante (iii)) y $\tilde{f}_r = 100.0$ (cuadrante (iv)).

En el cuadrante (i) de la Fig. 4.14, con $\Gamma = 1.0$ y $\tilde{f}_r = 0.5$, se observa que una constante de flexión pequeña admite desviaciones significativas respecto a la curvatura preferencial, las cuales implican un costo energético que puede ser fácilmente compensado por ensamblarse sobre el molde. Si el radio del molde es muy pequeño ($R_{rm} < 0.4$ en este caso), aún podría ser termodinámicamente favorable ensamblarse sobre el molde, pero se requeriría una energía de adsorción pronunciada. Es por eso que la esquina inferior izquierda siempre muestra un color azul, indicando que ese valor de γ_m no logra compensar las penalizaciones por energía de flexión. En otras palabras, cuando R_{rm} es extremadamente reducido, la ventaja energética del molde no es suficiente para contrarrestar el coste en energía de flexión. En los cuadrantes (ii) y (iii), se incrementa la rigidez de la cápside al hacer $\tilde{f}_r = 5.0$ y $\tilde{f}_r = 10.0$ respectivamente, por lo que reduce la región en color verde. En el cuadrante (iv), con $\tilde{f}_r = 100$, el costo de desviaciones de curvatura es tan elevado que es más conveniente para el virus que su cápside se ensamble fuera del molde si este se desvía en más de un 20 % hacia radios más pequeños y más de un 30 % hacia radios más grandes. A pesar de esta condición extrema de rigidez, aún queda una región en color verde que indica que la barrera de energía es menor cuando la cápside se ensambla sobre el molde que cuando lo hace fuera de el.

La asimetría de la parábola con relleno en color verde que indica cuándo $\Delta\mathcal{E}_m < \Delta\mathcal{E}^*$ es un reflejo de la asimetría de la energía de flexión, Ec. (3.3). Esto se debe a que es energéticamente menos costoso ensamblar una cápside con radios $R > R_T$ que con $R < R_T$, lo que resulta en una menor altura de la barrera de energía escalada.

El efecto de competición entre las barreras energéticas y la estabilidad de las cápsides en diferentes condiciones de autoensamblaje se discuten en la siguiente sección, donde se estudian los diagramas de autoensamblaje que consideran tanto la altura de la barrera de energía como la estabilidad de las cápsides completamente formadas para determinar la vía óptima de autoensamblaje. En dicha sección, se brinda una justificación más apropiada a este fenómeno de estabilidad a costa de la repulsión entre el molde y las subunidades.

4.9 Diagrama de Fase de Autoensamblaje con Dos Criterios Energéticos

Los diagramas de fase de las Secciones 4.8 y 4.7 permiten determinar de forma independiente los parámetros de autoensamblaje óptimos que conducen a tener un estado final de agregación más estable (Fig. 4.13) o una menor altura de la barrera de energía (Fig. 4.14). Sin embargo, es finalmente el conjunto de estas características lo que determina la mejor vía de autoensamblaje. Es decir, se busca el sistema que tenga tanto la menor barrera energética como el estado más estable.

En los diferentes cuadrantes de la Fig. 4.15, se presenta un diagrama de fase de autoensamblaje que distingue 5 regiones diferentes en la comparación entre ensamblarse sobre el molde o fuera de él. Las diferentes regiones se categorizan de la siguiente manera: Si $\Delta\mathcal{E}_m^* < \Delta\mathcal{E}^*$ al mismo tiempo que $\Delta\mathcal{E}_{cm} < \Delta\mathcal{E}_c$, entonces las cápsides que se autoensamblan en contacto con el molde tiene una menor barrera de energía y un estado final de agregación más estable. Esta región se designa con color verde. Si ensamblarse sobre el molde implica tener una menor barrera energética pero finalmente un estado menos estable en comparación con ensamblarse fuera de él, la región se pinta de color amarillo. En el caso contrario, en donde el contacto con el molde requiera de un salto energético más grande pero que éste finalmente conduzca a un estado más estable se designa el color rojo. Si la cápside tiene menor barrera energética y un estado de agregación más estable al ensamblarse fuera del molde, la región será de color azul. Finalmente, si ninguno de los sistemas produce cápsides estables, es decir que $\Delta\mathcal{E}_{cm} > \Delta\mathcal{E}_c > 0$ o que $\Delta\mathcal{E}_m > \Delta\mathcal{E}_{cm} > 0$, la región se identifica como totalmente metaestable y se le asocia el color gris.

Un resumen de las condiciones energéticas que definen las fases de autoensamblaje se presenta en el código cromático del Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Código cromático del diagrama de fase de autoensamblaje de la Fig. 4.15	
Fases de autoensamblaje de cápsides virales	Color asignado
$\Delta\mathcal{E}_m^* < \Delta\mathcal{E}^*$ y $\Delta\mathcal{E}_{cm} < \Delta\mathcal{E}_c$	verde
$\Delta\mathcal{E}_m^* < \Delta\mathcal{E}^*$ y $\Delta\mathcal{E}_{cm} > \Delta\mathcal{E}_c$	amarillo
$\Delta\mathcal{E}_m^* > \Delta\mathcal{E}^*$ y $\Delta\mathcal{E}_{cm} < \Delta\mathcal{E}_c$	rojo
$\Delta\mathcal{E}_m^* > \Delta\mathcal{E}^*$ y $\Delta\mathcal{E}_{cm} > \Delta\mathcal{E}_c$	azul
Formación de cápsides metaestables	gris

Tabla 4.1: Código cromático del diagrama de autoensamblaje combinado de la Fig. 4.15.

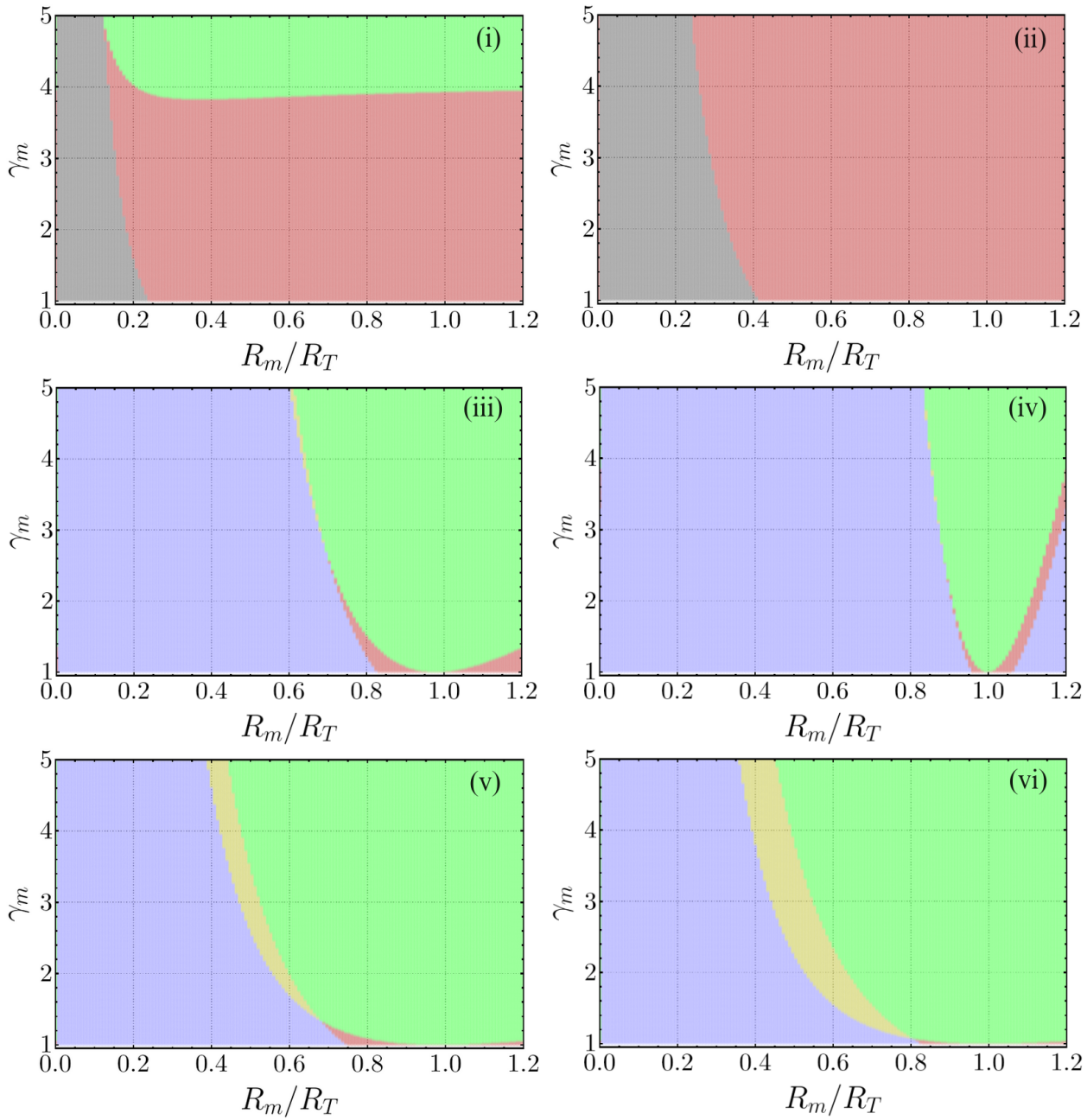


Figura 4.15: Diagrama de fase de autoensamblaje determinado mediante el criterio energético de la altura de la barrera de energía en combinación con el criterio de la energía libre escalada de cierre en función de R_m y γ_m . Este diagrama exhibe cinco regiones de autoensamblaje clasificadas según el valor relativo de la altura de la barrera de energía y la energía libre escalada de cierre. Los diagramas de fase de los primeros cuatro cuadrantes fueron obtenidos con un valor fijo de la supersaturación, *i.e.*, $\Gamma = 1.0$ y para los siguientes valores de la constante de flexión, $\tilde{f}_r$: $\tilde{f}_r = 0.1$ (cuadrante (i)), $\tilde{f}_r = 0.5$ (cuadrante (ii)), $\tilde{f}_r = 10.0$ (cuadrante (iii)) y $\tilde{f}_r = 100.0$ (cuadrante (iv)). Los diagramas de fase de los cuadrantes (v) y (vi) fueron obtenidos con $\Gamma = 3.0$ y $\tilde{f}_r = 5.0$ y $\Gamma = 8.0$ y $\tilde{f}_r = 10.0$, respectivamente. Las cinco fases de este diagrama se clasifican según el código cromático presentado en el Tabla 4.1.

En los diagramas de fase de la Fig. 4.15 se observa que para desviaciones pronunciadas de la curvatura preferencial y valores bajos de γ_m , es energéticamente favorable que la cápside se ensamble fuera del radio del molde, por lo que la región que tiene estas características se identifica con color azul. En el caso contrario, para valores de R_m cercanos a R_T y valores de γ_m mayores a 1, la cápside encuentra una situación favorable al ensamblarse sobre el molde preformado, lo que se representa en color verde. Los casos en los que $\Delta\mathcal{E}_m^* < \Delta\mathcal{E}^*$ junto con $\Delta\mathcal{E}_{cm} > \Delta\mathcal{E}_c$, y aquellos en los que $\Delta\mathcal{E}_m^* > \Delta\mathcal{E}^*$ al mismo tiempo que $\Delta\mathcal{E}_{cm} < \Delta\mathcal{E}_c$, se describen como fases de color amarillo y rojo, respectivamente. Las ventajas energéticas «parciales», donde la barrera energética de un sistema es más grande pero el estado final que produce es más estable, o viceversa, son sumamente sensibles a las condiciones ambientales. Sin embargo, en los cuadrantes (v) y (vi) se observa la existencia de estas fases energéticas.

4.10 Desviaciones Relativas de la Curvatura Preferencial

En esta sección, se analiza la altura de la barrera de energía escalada, la energía libre escalada de cierre, el tamaño crítico y el ritmo de autoensamblaje en función de las desviaciones relativas del radio que adopta el molde respecto a la curvatura preferencial definida por R_T . El objetivo principal es mostrar que no es igual de favorable ensamblarse sobre moldes pequeños o grandes, comparando la evolución de las Ecs. (4.17), (4.12), (4.16) y (2.113) cuando una cápside se ensambla sobre un molde esférico y este se desvía cierta cantidad $\delta_R R_T$ hacia radios menores y mayores con respecto a R_T . En este caso, el radio del molde se escribe como $R_m = R_T(1 \pm \delta_R)$, en donde $0 < \delta_R \leq 1$. La introducción de este modelo permite expresar las desviaciones de curvatura en cualquier dirección. En resumen, las desviaciones hacia radios menores que R_T ocurren cuando $R_m = R_T(1 - \delta_R)$, mientras que las desviaciones hacia radios mayores que R_T se observan cuando $R_m = R_T(1 + \delta_R)$.

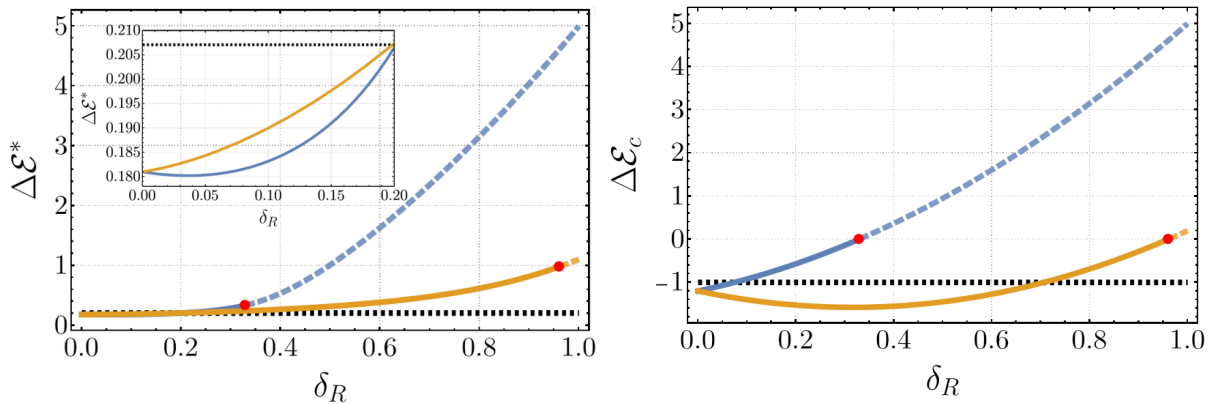


Figura 4.16: Gráficas representativas de la altura de la barrera de energía y la energía en el estado final de autoensamblaje en función de la desviación relativa, δ_R . Las curvas del panel izquierdo se obtienen con la Ec. (4.17), mientras que las del panel derecho se obtienen con la Ec. (4.12). Ambas gráficas se generaron utilizando los parámetros $\Gamma = 1.0$, $\tilde{f}_r = 5.0$, y $\gamma_m = 1.2$. Con las curvas azules, se representan los valores de $\Delta\mathcal{E}^*$ (panel izquierdo) y $\Delta\mathcal{E}_c$ (panel derecho) para desviaciones de curvatura hacia radios menores en comparación con R_T , mientras que las líneas naranjas representan los valores de la barrera de energía escalada (panel izquierdo) y la energía libre escalada de cierre (panel derecho) cuando el radio del molde es $R_m = R_T(1 + \delta_R)$. La sección discontinua representa la formación de cápsides metaestables, mientras que la sección continua de las curvas a color indica que se formará una cápside estable.

En la Figura 4.16, se presentan la altura de la barrera de energía escalada (panel izquierdo) y la energía libre escalada de cierre (panel derecho) en función de δ_R . En el panel izquierdo, se destaca que una cápside formada sobre un molde de mayor tamaño que su curvatura preferencial muestra una barrera de energía más alta a desviaciones pequeñas (menores al 20 % en estas condiciones). A medida que la desviación relativa de curvatura se vuelve más pronunciada, la cápside ensamblada sobre un molde con $R_m > R_T$ exhibe una barrera energética menor debido a la asimetría en la energía de flexión (ver Ec. 3.3). En el panel derecho, se observa que un aumento en δ_R provoca una pérdida progresiva de estabilidad en cápsides ensambladas sobre moldes, especialmente cuando $R_m < R_T$ (línea azul), donde esto ocurre a una desviación de aproximadamente el 10 %. En contraste, la línea naranja indica que la metaestabilidad surge en sistemas donde $R_m > R_T$ hasta que el radio del molde es cerca del doble del radio de la curvatura preferencial. Esta es la razón principal por la que las cápsides ensambladas sobre moldes más grandes suelen ser más estables.

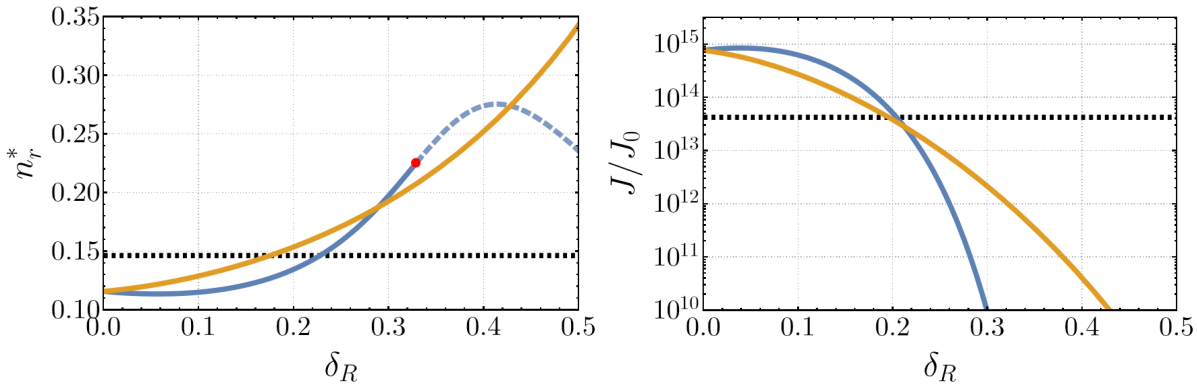


Figura 4.17: Gráficas representativas del tamaño del núcleo crítico escalado, n_r^* , y el cociente J/J_0 en función de la desviación relativa del radio de flexión, δ_R . Las curvas del panel izquierdo se obtienen con la Ec. (4.16), mientras que las del panel derecho se obtienen con la Ec. (2.113). Ambas gráficas se generaron utilizando los parámetros $\Gamma = 1.0$, $\tilde{f}_r = 5.0$, $\gamma_m = 1.2$, $n_T = 180$, y $\Delta g \approx -5, k_B T$. Con las curvas azules, se representan los valores de n_r^* (panel izquierdo) y J/J_0 (panel derecho) para desviaciones de curvatura hacia radios menores en comparación con R_T , mientras que las líneas naranjas representan los valores del tamaño del núcleo crítico (panel izquierdo) y el cociente J/J_0 (panel derecho) cuando el radio del molde se desvía del de curvatura preferencial por un factor $R_T \delta_R$. La sección discontinua representa la formación de cápsides metaestables, mientras que la sección continua de las curvas a color indica que se formará una cápside estable.

La Fig. 4.17, muestra n_r^* (panel izquierdo) y J/J_0 (panel derecho) en función de δ_R . En el panel izquierdo, se observa que para desviaciones pequeñas, es decir, $\delta_R \lesssim 0.28$, el tamaño del núcleo crítico es menor cuando $R_m < R_T$. A medida que δ_R aumenta, se identifica un punto donde la curva azul se cruza con la naranja. Esto indica que bajo ciertas condiciones de autoensamblaje, el tamaño del núcleo necesario para formar una cápside con un radio mayor a R_T es menor que el requerido para una cápside con $R_m < R_T$. Este hallazgo es contraintuitivo e interesante, pero es crucial reconocer que puede no observarse en todos los escenarios.

Por su parte, el panel derecho de la Fig. 4.17 muestra que cuando $R_m = R_T$ el ritmo de autoensamblaje con molde será más alto que en el caso clásico debido a que $\gamma_m > 1$. A medida que el radio del molde se aleja del radio de curvatura preferencial, la ventaja cinética que supone ensamblarse sobre el molde disminuye, aunque lo hace más lentamente si $R_m > R_T$. Si el radio del molde está extremadamente desviado de R_T hacia radios más grandes, entonces los núcleos de las cápsides que tienen contacto con el molde se ensamblarán más lentamente. En contraste, si $R_m \ll R_T$, el tamaño

crítico podría tender al de una subunidad individual, lo que lleva a que al inicio del autoensamblaje todas las subunidades sean núcleos.

4.11 Conclusiones

En este capítulo, se desarrolló un modelo teórico simple para cuantificar la *interacción molde-subunidad* y determinar el papel de un molde esférico en el Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV). La conceptualización, metodología, análisis y resultados obtenidos a partir de la descripción fisicoestadística de este proceso, junto con la inclusión de diagramas de fase con múltiples criterios energéticos y el estudio del autoensamblaje en función de las desviaciones relativas a la curvatura preferencial, constituyen una de las contribuciones principales de esta tesis.

La consideración de proteínas de andamiaje en forma de un molde esférico preformado en la solución de autoensamblaje permite modelar la *interacción molde-subunidad* como un potencial químico de adsorción. Este potencial representa la diferencia de energía entre tener n subunidades libres en solución o en contacto con el molde, y permite estudiar la influencia de un molde en (i) el tamaño del núcleo crítico, (ii) la altura de la barrera de nucleación, y (iii) el ritmo de nucleación. La conclusión más relevante en este sentido se puede resumir como sigue: la presencia de molde de tamaño similar al preferencial en el AECV generalmente se traduce en una disminución en el tamaño del núcleo crítico y de la altura de la barrera de energía, lo que, a su vez, resulta en una aceleración del ritmo de producción de núcleos en comparación con los modelos presentados en los Capítulos 2 y 3.

En este capítulo, se introdujo el concepto de *diagramas de fase de autoensamblaje* con múltiples criterios energéticos como una herramienta gráfica para comprender el impacto dinámico y cinético en el estado final de autoensamblaje. Estos diagramas permiten analizar la estabilidad de las cápsides completamente formadas, determinar bajo qué condiciones es energéticamente favorable una vía de autoensamblaje frente a otra, y validar hipótesis sobre el papel de los distintos parámetros en el autoensamblaje.

Los diagramas de fase que utilizan los dos criterios energéticos empleados en esta tesis, *i.e.*, (i) el criterio energético de la altura de la barrera de energía y (ii) el criterio de la energía libre escalada de cierre, determinan cuál es la vía de autoensamblaje óptima desde el punto de vista dinámico (en el caso (i)) y cinético (en el caso (ii)). Esto es, logran determinar qué es cinéticamente favorable y energéticamente más estable, si ensamblarse en presencia o en ausencia del molde. En este ámbito, se encontró que para grandes desviaciones respecto a la curvatura preferencial, ya sea $R_{rm} < R_T$ o $R_{rm} > R_T$, y valores bajos del factor de escalamiento, γ_m , la cápside resulta más estable y con una menor barrera de energía si se autoensambla fuera del radio del molde. Sin embargo, si el costo energético de la desviación de curvatura es ampliamente compensado por γ_m , la cápside será más estable y tendrá una barrera de energía más baja si se ensambla sobre el molde.

Particularmente, en el contexto de análisis de estabilidad de estructuras macromoleculares, los diagramas de fase tienen dos consecuencias fundamentales: (i) En el AECV, estos diagramas tienen la capacidad de determinar, mediante cantidades fácilmente medibles experimental y computacionalmente, cuándo una cápside será estable o metaestable, lo que, en determinado momento, podría habilitar mecanismos innovadores de terapia antiviral. El argumento detrás de esto es que al modificar las condiciones fisicoquímicas de autoensamblaje, se puede intentar frustrar o favorecer la formación de cápsides virales, e incluso imponer condiciones para que las cápsides se ensamblen pero no puedan almacenar material genético. (ii) En la búsqueda del diseño de estructuras nanométricas

artificiales que encapsulan partículas específicas (orgánicas o artificiales), es crucial determinar las condiciones que garantizan una encapsulación óptima. En este sentido, se podría intentar definir, por ejemplo, las interacciones que necesita un vehículo en la nanoescala para que logre ser metaestable en condiciones específicas (con el objetivo de que sea capaz de liberar la carga encapsulada en el momento oportuno) , pero estable en otras condiciones (para que pueda resistir condiciones ambientales extremas). Estos dos comportamientos extremos son de gran importancia en tareas como la entrega precisa de medicamentos en el cuerpo humano.

La realización de tres tipos de diagramas de fase de autoensamblaje facilita concluir que tener una menor altura de la barrera de energía no necesariamente conduce a un estado final de autoensamblaje estable. Asimismo, estos diagramas nos ayudan a apreciar la importancia de la cinética en el AECV.

Finalmente, el análisis de las desviaciones de curvatura hacia radios menores y mayores respecto a la curvatura preferencial permite entender físicamente las implicaciones de la asimetría del costo energético de flexión. Se observa que el autoensamblaje a radios más grandes en relación con la curvatura preferencial suele ser la mejor opción.

Conclusiones y Observaciones Generales

En esta tesis, se realizó un análisis del Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV) desde una perspectiva física, explorando su complejidad y proporcionando una sólida fundamentación teórica de este fenómeno. La investigación se centró en la reformulación de una teoría integral y fácilmente generalizable del AECV, que reproduce los resultados previamente reportados por la Teoría Clásica de Nucleación de Cápsides Virales (TCNCV), además de admitir la inclusión directa de la energía de flexión y la presencia de un molde esférico en la solución de autoensamblaje. Los tres capítulos principales, Capítulos 2, 3 y 4, abordaron diferentes aspectos críticos de este fenómeno, de manera que ofrecen contribuciones importantes al campo de la *virología física*.

En el Capítulo 2, se desarrolló un marco teórico integral, y de fácil generalización del AECV, utilizando las herramientas de la Teoría Clásica de Nucleación (TCN), la teoría de autoensamblaje en equilibrio y las ideas fisicoquímicas de agregación. Esta primera parte de la tesis sirvió como una base sólida para extender la TCNCV y considerar grados de libertad adicionales, construyendo así modelos de autoensamblaje más complejos y llevando a la formulación de la Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales (TAECV). Se destacó la importancia de la barrera energética y se presentó una visión detallada de la cinética de autoensamblaje.

El Capítulo 3 amplió la TAECV al incorporar la energía de flexión, revelando efectos físicos importantes a considerar en la cinética y las vías óptimas del AECV. Adicionalmente, se explicaron fenómenos emergentes como la reducción del tamaño del núcleo crítico y de la altura de la barrera de energía. Más aún, se introdujo el concepto de «*trayectoria de compresión*» y se caracterizó la región de estabilidad en términos de la rigidez de las cápsides.

El modelo permite predecir el tamaño y número de subunidades de una cápside que se ha ensamblado bajo ciertas condiciones ambientales, las cuales se definen mediante dos parámetros escalados del sistema: (i) la supersaturación, Γ , y (ii) la constante de flexión, $\tilde{f}_r$. Para estudiar la cinética de AECV, se implementaron ideas de la TCN de sistemas multicomponentes, lo que permitió derivar analíticamente una expresión para el ritmo de autoensamblaje y explicar los cambios que supone considerar la energía de flexión en el ensamblaje y desensamblaje de cápsides virales.

Estos hallazgos son de suma importancia para entender cómo inducir la producción de cápsides de tamaño óptimo y controlar su estabilidad a través de su rigidez y parámetros ajustables experimental o computacionalmente, como la concentración de sal y de subunidades libres, pH, presión y temperatura, lo que, a su vez, presenta desafíos y oportunidades en el diseño y manipulación de partículas virales.

Al final de este capítulo, se estudiaron las propiedades físicas, geométricas y mecánicas de cápsides virales reales con estructura esférica, a partir de donde se obtuvieron resultados concretos para una cápside del Virus de Simio 40 (VS40).

Finalmente, en el Capítulo 4, se introdujo un modelo teórico para estudiar la influencia de las proteínas de andamiaje en el AECV mediante la incorporación de un molde esférico preformado en la solución en donde se difunden las subunidades proteicas. Se destacó especialmente cómo la presencia del molde generalmente disminuye el tamaño del núcleo crítico y la barrera energética, acelerando así el ritmo de ensamblaje y desensamblaje de cápsides virales. La comparación entre sistemas donde las cápsides se ensamblan en contacto con el molde y fuera de este resulta una vía de confirmación del beneficio que supone la presencia de proteínas de andamiaje en el AECV. En otras palabras, se explicó que es realmente energéticamente beneficioso que las proteínas de andamiaje estén presentes.

La introducción de diagramas de fase de autoensamblaje con múltiples criterios energéticos resultó valioso para determinar la estabilidad de las cápsides, explorar estrategias para optimizar su formación y estabilidad estructural, y comprender cuáles son y cómo inducir las condiciones óptimas bajo las cuales los virus y viriones mantienen su integridad y funcionalidad biológica.

En síntesis, esta tesis representa una contribución importante a la *virología física*, ya que profundiza en los mecanismos de formación de cápsides virales vacías y facilita la predicción y control de su autoensamblaje mediante modelos teóricos. Las aplicaciones de este trabajo podrían tener implicaciones profundas en biología estructural y virología, abriendo nuevas posibilidades en el diseño de fármacos, nanoestructuras para aplicaciones biomédicas y terapias antivirales.

Perspectivas: Futuras Líneas de Investigación

Las futuras líneas de investigación derivadas de esta tesis se pueden explicar en dos puntos: (i) Investigar el AECV junto con proteínas de andamiaje para formar cápsides virales esféricas y tubulares.¹ (ii) Estudiar la influencia de la cinética en la determinación del tamaño final de las cápsides.

La primera línea de investigación tiene como objetivo el desarrollo de un marco teórico que abarque el AECV tanto esféricas como tubulares en presencia de proteínas de andamiaje *discretas* en vez de un molde esférico preformado. Dicho de otra forma, este enfoque exploraría la dinámica y cinética del autoensamblaje de cápsides y la influencia de proteínas de andamiaje, considerando a estas últimas como una segunda especie de moléculas en el sistema. La investigación está motivada por el papel fundamental, aunque poco comprendido, de las proteínas de andamiaje en el Autoensamblaje de Virus (AEV) «*grandes*», así como en los microcompartimentos bacterianos y artificiales.

Al igual que en los tres capítulos principales de esta tesis, este modelo de AECV emplearía herramientas de la teoría de autoensamblaje en equilibrio, la Teoría Clásica de Nucleación (TCN), y los principios fisicoquímicos que subyacen a este proceso. A través de este marco teórico, será posible calcular la barrera de energía, el número crítico de agregación y el ritmo de autoensamblaje, así como generar diagramas de fase que representen de manera gráfica las rutas óptimas de autoensamblaje, clasificando el espacio de fase en categorías de autoensamblaje favorable y desfavorable.

En el Capítulo 3, Secciones 3.2.3 y 3.3, se describió cómo una cápside parcial podría explorar el paisaje de energía variando tanto el número de subunidades, n , como el radio, R , o el grado de completitud, θ . Una de las hipótesis del modelo es que, después de alcanzar el tamaño crítico (n_r^* , R_r), la cápside parcial continua «*viajando*» sobre la superficie de energía siguiendo la Trayectoria de Mínima Energía (TME) hasta que pierde el confinamiento en la dirección R_r . En este punto, se asume que el agregado intermedio disminuye su radio de curvatura mientras mantiene el número de subunidades constante hasta que se cierra, formando una cápside vacía. Esta suposición fue implementada en el estudio de la cinética de la Sección 3 al considerar el caso en el que $\beta_R \gg \beta_n$. Sin embargo, este escenario es muy ideal y, por ende, el concepto de la *trayectoria de compresión* resulta artificial para describir el Autoensamblaje de Cápsides Virales (AECV). Por esta razón, se requiere más investigación para estudiar los mecanismos de cierre en el AECV. Con el objetivo de resolver esta cuestión, se podrían implementar simulaciones de DB que permitan modelar la cinética del proceso y determinar una distribución de radios de cierre que caracterizan el tamaño de una cápside cerrada. Estos resultados podrían tener un impacto significativo en la virología física y en las estrategias potenciales para interrumpir la replicación viral.

¹Este enfoque consideraría dos tipos de subunidades para la formación del la cápside, en contraste con la simplificación del modelo abordada en esta tesis, que solo considera un tipo de subunidades proteicas y un molde esférico preformado en la solución.

Lista de Publicaciones

L. Dagdug, J. Peña e I. Pompa-García, *Diffusion Under Confinement: A Journey Through Counterintuition* (Springer Nature: Cham, Switzerland, 2024), [DOI:10.1007/978-3-031-46475-1](https://doi.org/10.1007/978-3-031-46475-1).

J. Peña, D. Hernandez, L. Dagdug y D. Reguera, “Autoensamblaje de Cápsides Virales: Teoría y Simulación”, [Contactos, Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería](#), En proceso de publicación (2024)

J. Peña, L. Dagdug y D. Reguera, “On the influence of bending energy on the assembly of spherical viral capsids”, [The Journal of Chemical Physics](#) **163**, 055101 (2025)

J. Peña, L. Dagdug y D. Reguera, “Minimum theoretical model of viral capsid self-assembly on a spherical scaffold”, [J. Chem. Phys.](#) **163**, 205101 (2025)

Referencias

- [1] K. M. Smith, *Viruses* (Cambridge University Press, 1963).
- [2] D. R. Harper, *Viruses: Biology, Applications, and Control* (Garland Science, 2011).
- [3] A. Aranda, *En la frontera de la vida: Los virus* (Fondo de cultura económica, 2017).
- [4] P. Lostroh, *Molecular and Cellular Biology of Viruses* (Garland Science, 2019).
- [5] D. L. D. Caspar y A. Klug, "Physical principles in the construction of regular viruses", [Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology](#) **27**, 1-24 (1962).
- [6] A. Luque y D. Reguera, "The Structure of Elongated Viral Capsids", [Biophysical Journal](#) **98**, 2993-3003 (2010).
- [7] D. Baltimore, "Expression of animal virus genomes", [Bacteriological Reviews](#) **35**, PMC378387, 235-241 (1971).
- [8] E. V. Koonin, M. Krupovic y V. I. Agol, "The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution?", [Microbiology and Molecular Biology Reviews](#) **85**, 10.1128/mmbr.00053-21 (2021).
- [9] D. Flecknoe, B. C. Wakefield y A. Simmons, "Plagues & wars: the Spanish Flu pandemic as a lesson from history", [Medicine, Conflict and Survival](#) **34**, PMID: 29764189, 61-68 (2018).
- [10] N. Klimas, A. O. Koneru y M. A. Fletcher, "Overview of HIV", [Psychosomatic Medicine](#) **70**, 523-530 (2008).
- [11] Y. Shi et al., "An overview of COVID-19", [J Zhejiang Univ Sci B](#) **21**, 343-360 (2020).
- [12] S. Deng et al., "Viral Vector Vaccine Development and Application during the COVID-19 Pandemic", [Microorganisms](#) **10**, PMID: 35889169, 1450 (2022).
- [13] T. Skern, "2019: Archives of Virology celebrates its eightieth birthday with a scientific symposium", [Archives of Virology](#) **165**, 1-3 (2020).
- [14] W. Stanley, "Isolation of a Crystalline Protein Possessing the Properties of Tobacco-Mosaic Virus", [Science](#) **81**, 644-645 (1935).
- [15] H. Fraenkel-Conrat y R. Williams, "Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components", [Proceedings of the National Academy of Sciences](#) **41**, 690-698 (1955).
- [16] J. Bancroft y E. Hiebert, "Formation of an infectious nucleoprotein from protein and nucleic acid isolated from a small spherical virus", [Virology](#) **32**, 354-356 (1967).
- [17] H. Ernest, "A Study of the Self-Assembly Process in Vitro of Three Spherical Plant Viruses", Tesis doct. (1969).
- [18] R. F. Garmann, M. Comas-Garcia, C. M. Knobler y W. M. Gelbart, "Physical Principles in the Self-Assembly of a Simple Spherical Virus", [Accounts of Chemical Research](#) **49**, 48-55 (2016).
- [19] A. Chaudhary y R. D. Yadav, "A review on virus protein self-assembly", [Journal of Nanoparticle Research](#) **21**, 254 (2019).

- [20] N. Grigorieff y S. C. Harrison, “Near-atomic resolution reconstructions of icosahedral viruses from electron cryo-microscopy”, [Current Opinion in Structural Biology](#) **21**, 265-273 (2011).
- [21] J. T. Kaelber, C. F. Hryc y W. Chiu, “Electron Cryomicroscopy of Viruses at Near-Atomic Resolutions”, [Annual Review of Virology](#) **4**, 287-308 (2017).
- [22] W. Jiang y L. Tang, “Atomic cryo-EM structures of viruses”, [Current Opinion in Structural Biology](#) **46**, 122-129 (2017).
- [23] D. Luque y J. R. Castón, “Cryo-electron microscopy for the study of virus assembly”, [Nature Chemical Biology](#) **16**, 231-239 (2020).
- [24] M. G. Mateu, “The Structural Basis of Virus Function”, en *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook*, ed. por M. G. Mateu (Springer Netherlands, Dordrecht, 2013), págs. 3-51.
- [25] W. H. Roos, R. Bruinsma y G. J. L. Wuite, “Physical virology”, [Nature Physics](#) **6**, 733-743 (2010).
- [26] P. Buzón, S. Maity y W. H. Roos, “Physical virology: From virus self-assembly to particle mechanics”, [WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology](#) **12**, e1613 (2020).
- [27] V. P. Zhdanov, “Kinetics of virus entry by endocytosis”, [Physical Review E](#) **91**, 042715 (2015).
- [28] T. Wiegold, S. Klinge, R. Gilbert y G. Holzapfel, “Numerical simulation of the viral entry into a cell driven by receptor diffusion”, [Computers & Mathematics with Applications](#) **84**, 224-243 (2021).
- [29] R. F. Bruinsma et al., “Viral Self-Assembly as a Thermodynamic Process”, [Physical Review Letters](#) **90**, 248101 (2003).
- [30] A. McPherson, “Micelle formation and crystallization as paradigms for virus assembly”, [BioEssays](#) **27**, 447-458 (2005).
- [31] R. Zandi et al., “Classical nucleation theory of virus capsids”, [Biophysical Journal](#) **90**, 1929-1948 (2006).
- [32] T. T. Nguyen, R. F. Bruinsma y W. M. Gelbart, “Continuum Theory of Retroviral Capsids”, [Physical Review Letters](#) **96**, 078102 (2006).
- [33] A. Luque et al., “Physics of shell assembly: line tension, hole implosion, and closure catastrophe”, [The Journal of Chemical Physics](#) **136**, 184507 (2012).
- [34] J. M. Almendral, “Assembly of Simple Icosahedral Viruses”, en *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook*, ed. por M. G. Mateu (Springer Netherlands, Dordrecht, 2013), págs. 307-328.
- [35] R. F. Garmann, M. Comas-Garcia, C. M. Knobler y W. M. Gelbart, “Physical Principles in the Self-Assembly of a Simple Spherical Virus”, [Accounts of Chemical Research](#) **49**, doi: 10.1021/acs.accounts.5b00350, 48-55 (2016).
- [36] M. Hagan y G. M. Grason, “Equilibrium mechanisms of self-limiting assembly”, [Review of Modern Physics](#) **93**, 025008 (2021).
- [37] A. A. Simpson et al., “Structure of the bacteriophage ϕ 29 DNA packaging motor”, [Nature](#) **408**, 745-750 (2000).
- [38] D. E. Smith et al., “The bacteriophage straight ϕ 29 portal motor can package DNA against a large internal force”, [Nature](#) **413**, PMID: 11607035, 748-752 (2001).

- [39] I. Ivanovska, G. Wuite, B. Jönsson y A. Evilevitch, “Internal DNA pressure modifies stability of WT phage”, [Proceedings of the National Academy of Sciences](#) **104**, 9603-9608 (2007).
- [40] S. Sun, V. B. Rao y M. G. Rossmann, “Genome packaging in viruses”, [Current Opinion in Structural Biology](#) **20**, 114-120 (2010).
- [41] M. Hagan y O. M. Elrad, “Understanding the Concentration Dependence of Viral Capsid Assembly Kinetics—the Origin of the Lag Time and Identifying the Critical Nucleus Size”, [Biophysical Journal](#) **98**, 1065-1074 (2010).
- [42] A. Luque, “Structure, mechanical properties, and self-assembly of virus capsids”, Tesis doct. (Departament de Física Fonamental, Universitat de Barcelona, 2011).
- [43] C. Mendoza y D. Reguera, “Shape selection and mis-assembly in viral capsid formation by elastic frustration”, [eLife](#) **9**, e52525 (2020).
- [44] M. Hagan y R. Zandi, “Recent advances in coarse-grained modeling of virus assembly”, [Current Opinion in Virology](#) **18**, Antiviral strategies: Virus structure and expression, 36-43 (2016).
- [45] M. Hagan, R. Zandi y C. Uetrecht, “Overview of the 2023 Physical Virology Gordon Research Conference: Viruses at Multiple Levels of Complexity”, [Viruses](#) **16**, 10.3390/v16060895 (2024).
- [46] P. van Rijn y R. Schirhagl, “Viruses, Artificial Viruses and Virus-Based Structures for Biomedical Applications”, [Advanced Healthcare Materials](#) **5**, 1386-1400 (2016).
- [47] P. D. Robbins y S. C. Ghivizzani, “Viral vectors for gene therapy”, [Pharmacology & Therapeutics](#) **80**, PMID: 9804053, 35-47 (1998).
- [48] K. T. Nam et al., “Virus-Enabled Synthesis and Assembly of Nanowires for Lithium Ion Battery Electrodes”, [Science](#) **312**, 885-888 (2006).
- [49] R. Twarock y A. Luque, “Structural puzzles in virology solved with an overarching icosahedral design principle”, [Nature Communications](#) **10**, 4414 (2019).
- [50] D. M. Salunke, D. L. D. Caspar y R. L. Garcea, “Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1”, [Biophysical Journal](#) **56**, 887-900 (1989).
- [51] T. Dokland, “Scaffolding proteins and their role in viral assembly”, [CMLS, Cell. Mol. Life Sci.](#) **56**, 580-603 (1999).
- [52] A. Luque y D. Reguera, “Theoretical Studies on Assembly, Physical Stability and Dynamics of Viruses”, en [Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook](#), ed. por M. G. Mateu (Springer Netherlands, Dordrecht, 2013), págs. 553-595.
- [53] D. Endres y A. Zlotnick, “Model-Based Analysis of Assembly Kinetics for Virus Capsids or Other Spherical Polymers”, [Biophysical Journal](#) **83**, 1217-1230 (2002).
- [54] P. van der Schoot y R. Zandi, “Kinetic theory of virus capsid assembly”, [Physical Biology](#) **4**, 296-304 (2007).
- [55] J. B. Bancroft, “The self-assembly of spherical plant viruses”, [Advances in Virus Research](#) **16**, 99-134 (1970).
- [56] A. Cuervo, M. I. Daudén y J. L. Carrascosa, “Nucleic Acid Packaging in Viruses”, en [Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook](#), ed. por M. G. Mateu (Springer Netherlands, Dordrecht, 2013), págs. 361-394.
- [57] C. A. Knight, “Constituents of viruses”, [Annual Review of Microbiology](#) **3**, 121-136 (1949).

- [58] W. K. Kegel y P. van der Schoot, “Competing Hydrophobic and Screened-Coulomb Interactions in Hepatitis B Virus Capsid Assembly”, [Biophysical Journal](#) **86**, 3905-3913 (2004).
- [59] A. Y. Morozov, R. F. Bruinsma y J. Rudnick, “Assembly of viruses and the pseudo-law of mass action”, [The Journal of Chemical Physics](#) **131**, 155101 (2009).
- [60] J. J. McManus, P. Charbonneau, E. Zaccarelli y N. Asherie, “The physics of protein self-assembly”, [Current Opinion in Colloid & Interface Science](#) **22**, 73-79 (2016).
- [61] D. Rapaport, J. Johnson y J. Skolnick, “Supramolecular self-assembly: molecular dynamics modeling of polyhedral shell formation”, [Computer Physics Communications](#) **121-122**, 231-235 (1999).
- [62] D. C. Rapaport, “Self-assembly of polyhedral shells: A molecular dynamics study”, [Phys. Rev. E](#) **70**, 051905 (2004).
- [63] A. Zlotnick et al., “A Theoretical Model Successfully Identifies Features of Hepatitis B Virus Capsid Assembly”, [Biochemistry](#) **38**, 14644-14652 (1999).
- [64] J. M. Johnson et al., “Regulating Self-Assembly of Spherical Oligomers”, [Nano Letters](#) **5**, 765-770 (2005).
- [65] J. R. Castón et al., “Three-dimensional Structure of Penicillium chrysogenum virus: A Double-stranded RNA Virus with a Genuine T=1 Capsid”, [Journal of Molecular Biology](#) **331**, 417-431 (2003).
- [66] T. Stehle, S. J. Gamblin, Y. Yan y S. C. Harrison, “The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution”, [Structure](#) **4**, 165-182 (1996).
- [67] Z. Xie y R. W. Hendrix, “Assembly in vitro of bacteriophage HK97 proheads”, [Journal of molecular biology](#) **253**, 74-85 (1995).
- [68] F. M. Kuni y A. I. Rusanov, “Statistical theory of aggregative equilibrium”, [Theoretical and Mathematical Physics](#) **2**, 192-206 (1970).
- [69] F. M. Kuni, A. I. Rusanov, A. K. Shchekin y A. P. Grinin, “Kinetics of Aggregation in Micellar Solutions”, [Russian Journal of Physical Chemistry A](#) **79**, 833-853 (2005).
- [70] P. Sollich, “Predicting phase equilibria in polydisperse systems”, [Journal of Physics: Condensed Matter](#) **14**, R79 (2001).
- [71] T. L. Hill, *An Introduction to Statistical Thermodynamics* (Dover Publications, 1960).
- [72] R. K. Pathria y P. D. Beale, *Statistical mechanics* (Butterworth-Heinemann, 1996).
- [73] D. M. Zuckerman, *Statistical Physics of Biomolecules : An Introduction* (CRC Press, 2010).
- [74] K. A. Dill y S. Bromberg, *Molecular Driving Forces: Statistical Thermodynamics in Chemistry and Biology* (Garland Science, 2002).
- [75] S. Singh y A. Zlotnick, “Observed Hysteresis of Virus Capsid Disassembly Is Implicit in Kinetic Models of Assembly”, [Journal of Biological Chemistry](#) **278**, 18249-18255 (2003).
- [76] M. Hagan y D. Chandler, “Dynamic pathways for viral capsid assembly”, [Biophysical Journal](#) **91**, 42-54 (2006).
- [77] D. Kashchiev, *Nucleation: Basic Theory with Applications* (Butterworth Heinemann, 2000).
- [78] H. Vehkamäki, *Classical Nucleation Theory in Multicomponent Systems* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006).
- [79] W.-F. Xue, “Nucleation: The Birth of a New Protein Phase”, [109](#), 1999-2000 (2015).

- [80] D. W. Oxtoby, “Homogeneous nucleation: theory and experiment”, [Journal of Physics: Condensed Matter](#) **4**, 7627 (1992).
- [81] K. A. Jackson, *Kinetic Processes: Crystal Growth, Diffusion, and Phase Transitions in Materials* (John Wiley y Sons, 2004).
- [82] A. Zlotnick y S. J. Stray, “How does your virus grow? Understanding and interfering with virus assembly”, [Trends in Biotechnology](#) **21**, 536-542 (2003).
- [83] D. T. Wu, “The time lag in nucleation theory”, [The Journal of Chemical Physics](#) **97**, 2644-2650 (1992).
- [84] C. Uetrecht et al., “High-resolution mass spectrometry of viral assemblies: Molecular composition and stability of dimorphic hepatitis B virus capsids”, [Proceedings of the National Academy of Sciences](#) **105**, 9216-9220 (2008).
- [85] V. Kalikmanov, *Nucleation Theory* (Springer Dordrecht, 2013).
- [86] R. Becker y W. Döring, “Kinetische Behandlung der Keimbildung in übersättigten Dämpfen”, alemán, [Annalen der Physik](#) **416**, 719-752 (1935).
- [87] S. Chandrasekhar, “Stochastic Problems in Physics and Astronomy”, [Reviews of Modern Physics](#) **15**, 1-89 (1943).
- [88] F. Abraham, *Homogeneous Nucleation Theory: The Pretransition Theory of Vapor Condensation*, Advances in theoretical chemistry. Supplement (AP, 1974).
- [89] M. Aznar, “Coarse-Grained Modeling of the Assembly and Mechanical Properties of Viruses”, Tesis doct. (Departament de Física Fonamental, Universitat de Barcelona, 2013).
- [90] D. Kashchiev, “Forms and applications of the nucleation theorem”, [The Journal of Chemical Physics](#) **125**, 014502 (2006).
- [91] D. Kashchiev, “On the relation between nucleation work, nucleus size, and nucleation rate”, [The Journal of Chemical Physics](#) **76**, 5098-5102 (1982).
- [92] T. L. Hill, *Thermodynamics of Small Systems* (Dover Publications, 1994).
- [93] A. Cordova, M. Deserno, W. M. Gelbart y A. Ben-Shaul, “Osmotic shock and the strength of viral capsids”, [Biophysical Journal](#) **85**, 70-74 (2003).
- [94] P. J. de Pablo y M. G. Mateu, “Mechanical Properties of Viruses”, en [Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook](#), ed. por M. G. Mateu (Springer Netherlands, Dordrecht, 2013), págs. 519-551.
- [95] L. R. Delgui y J. F. Rodríguez, “Virus Maturation”, en [Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook](#), ed. por M. G. Mateu (Springer Netherlands, Dordrecht, 2013), págs. 395-415.
- [96] D. Law-Hine et al., “Identification of a major intermediate along the self-assembly pathway of an icosahedral viral capsid by using an analytical model of a spherical patch”, [Soft Matter](#) **12**, 6728-6736 (2016).
- [97] R. Zandi y D. Reguera, “Mechanical properties of viral capsids”, [Physical Review E](#) **72**, 021917 (2005).
- [98] G. M. Grason, “Perspective: Geometrically frustrated assemblies”, [The Journal of Chemical Physics](#) **145**, 110901 (2016).
- [99] W. H. Roos y G. J. L. Wuite, “Nanoindentation Studies Reveal Material Properties of Viruses”, [Advanced Materials](#) **21**, 1187-1192 (2009).

- [100] W. H. Roos y G. J. L. Wuite, “Mechanical Properties of Viruses”, en *Emerging Topics in Physical Virology*, ed. por P. Stockley y R. Twarock (Imperial College Press, London, 2010), págs. 85-102.
- [101] W. H. Roos, I. L. Ivanovska, A. Evilevitch y G. J. L. Wuite, “Viral capsids: mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms”, *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 1484-1497 (2007).
- [102] I. L. Ivanovska et al., “Bacteriophage capsids: tough nanoshells with complex elastic properties”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 7600-7605 (2004).
- [103] G. Meng, J. Paulose, D. R. Nelson y V. N. Manoharan, “Elastic Instability of a Crystal Growing on a Curved Surface”, *Science* **343**, 634-637 (2014).
- [104] M. Castelnovo, “Viral self-assembly pathway and mechanical stress relaxation”, *Physical Review E* **95**, 052405 (2017).
- [105] J. Lidmar, L. Mirny y D. Nelson, “Virus shapes and buckling transitions in spherical shells”, *Physical Review E* **68**, 051910 (2003).
- [106] H. S. Seung y D. R. Nelson, “Defects in flexible membranes with crystalline order”, *Physical Review A, General Physics* **38**, 1005-1018 (1988).
- [107] H. Reiss, “The Kinetics of Phase Transitions in Binary Systems”, *The Journal of Chemical Physics* **18**, 840-848 (2004).
- [108] H. Trinkaus, “Theory of the nucleation of multicomponent precipitates”, *Physical Review B* **27**, 7372-7378 (1983).
- [109] D. Stauffer, “Kinetic theory of two-component (“hetero-molecular”) nucleation and condensation”, *Journal of Aerosol Science* **7**, 319-333 (1976).
- [110] K. Binder y D. Stauffer, “Statistical theory of nucleation, condensation and coagulation”, *Advances in Physics* **25**, 343-396 (1976).
- [111] H. Arstila, “Kinetic effect of cluster-cluster processes on homogeneous nucleation rates in one- and two-component systems”, *The Journal of Chemical Physics* **107**, 3196-3203 (1997).
- [112] J. L. J. Feder K.C. Russell y G. Pound, “Homogeneous nucleation and growth of droplets in vapours”, *Advances in Physics* **15**, 111-178 (1966).
- [113] R. Aris, *Vectors, tensors, and the basic equations of fluid mechanics*, Dover books on engineering (Dover Publications, 1989).
- [114] O. Bretscher, *Linear Algebra with Applications*, 4.^a ed. (Pearson, 2008).
- [115] W. Greub, *Linear Algebra*, 4.^a ed., Graduate Texts in Mathematics 23 (Springer-Verlag New York, 1975).
- [116] R. Larson, *Elementary Linear Algebra*, 7.^a ed. (Cengage Learning, 2012).
- [117] R. D. Hartschuh et al., “How rigid are viruses”, *Physical Review E* **78**, 021907 (2008).
- [118] W. Roos et al., “Squeezing Protein Shells: How Continuum Elastic Models, Molecular Dynamics Simulations, and Experiments Coalesce at the Nanoscale”, *Biophysical Journal* **99**, 1175-1181 (2010).
- [119] M. M. Gibbons y W. S. Klug, “Nonlinear finite-element analysis of nanoindentation of viral capsids”, *Physical Review E* **75**, 031901 (2007).

- [120] C. Carrasco et al., “DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus”, [Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America](#) **103**, 13706-13711 (2006).
- [121] M. G. M. van Rosmalen et al., “Effect of dsDNA on the Assembly Pathway and Mechanical Strength of SV40 VP1 Virus-like Particles”, [Biophysical journal](#) **115**, 1656-1665 (2018).
- [122] S. B. Juhl et al., “Assembly of Wiseana Iridovirus: Viruses for Colloidal Photonic Crystals”, [Advanced Functional Materials](#) **16**, 1086-1094 (2006).
- [123] N. Kol et al., “Mechanical properties of murine leukemia virus particles: effect of maturation”, [Biophysical Journal](#) **91**, 767-774 (2006).
- [124] A. Oppenheim, O. Ben-nun-Shaul, S. Mukherjee y M. Abd-El-Latif, “SV40 Assembly *In Vivo* and *In Vitro*”, [Computational and Mathematical Methods in Medicine](#) **9**, 673630 (2008).
- [125] R. C. Liddington et al., “Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution”, [Nature](#) **354**, 278-284 (1991).
- [126] M. Vera y P. Fortes, “Simian Virus-40 as a Gene Therapy Vector”, [DNA and Cell Biology](#) **23**, PMID: 15169607, 271-282 (2004).
- [127] P. Ceres y A. Zlotnick, “Weak Protein-Protein Interactions Are Sufficient To Drive Assembly of Hepatitis B Virus Capsids”, [Biochemistry](#) **41**, 11525-11531 (2002).
- [128] A. Zlotnick, “Are weak protein-protein interactions the general rule in capsid assembly?”, [Virology](#) **315**, 269-274 (2003).
- [129] C. A. Kerfeld et al., “Bacterial microcompartments”, [Nature Reviews Microbiology](#) **16**, PMID: 29563644, 277-290 (2018).
- [130] P. K. Hansma, V. B. Elings, O. Marti y C. E. Bracker, “Scanning Tunneling Microscopy and Atomic Force Microscopy: Application to Biology and Technology”, [Science](#) **242**, 209-216 (1988).
- [131] G. Binnig, C. F. Quate y C. Gerber, “Atomic Force Microscope”, [Physical Review Letters](#) **56**, 930-933 (1986).
- [132] F. M. Ohnesorge et al., “AFM review study on pox viruses and living cells”, [Biophysical Journal](#) **73**, 2183-94 (1997).
- [133] J. K. H. Hörber y M. J. Miles, “Scanning Probe Evolution in Biology”, [Science](#) **302**, 1002-1005 (2003).
- [134] W. J. Greenleaf, M. T. Woodside y S. M. Block, “High-resolution, single-molecule measurements of biomolecular motion”, [Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure](#) **36**, MEDLINE, 171-90 (2007).
- [135] S. Vahabi, B. Nazemi Salman y A. Javanmard, “Atomic force microscopy application in biological research: a review study”, [Iranian Journal of Medical Sciences](#) **38**, 76-83 (2013).
- [136] H. Wevers, *Virus nanoindentation by AMF*, animation based on research by W. Roos and G. Wuite, 2011.
- [137] L. D. Landau y E. M. Lifshitz, *Theory of Elasticity*, 3.^a ed., vol. Volume 7, Course of Theoretical Physics (Elsevier, Oxford, 1986).
- [138] J. N. G. Stephen P. Timoshenko, *Theory of Elasticity* (McGraw Hill, 1951).
- [139] M. Buenemann y P. Lenz, “Elastic properties and mechanical stability of chiral and filled viral capsids”, [Physical Review E](#) **78**, 051924 (2008).

- [140] T. T. Nguyen, R. F. Bruinsma y W. M. Gelbart, “Elasticity theory and shape transitions of viral shells”, [Physical Review E](#) **72**, 051923 (2005).
- [141] B. Stephanidis et al., “Elastic properties of viruses”, [Biophysical Journal](#) **93**, 1354-1359 (2007).
- [142] F. Crick y J. Watson, “Structure of Small Viruses”, [Nature](#) **177**, 473-475 (1956).
- [143] J. King, E. V. Lenk y D. Botstein, “Mechanism of head assembly and DNA encapsulation in Salmonella phage P22: II. Morphogenetic pathway”, [Journal of Molecular Biology](#) **80**, 697-731 (1973).
- [144] M. K. Showe y L. W. Black, “Assembly Core of Bacteriophage T4: an Intermediate in Head Formation”, [Nature New Biology](#) **242**, 70-75 (1973).
- [145] A. Aksyuk et al., “Subassemblies and Asymmetry in Assembly of Herpes Simplex Virus Procapsid”, [mBio](#) **6**, e01525-15 (2015).
- [146] C. Chowdhury et al., “Diverse bacterial microcompartment organelles”, [Microbiology and Molecular Biology Reviews](#) **78**, 438-468 (2014).
- [147] F. Mohajerani y M. Hagan, “The role of the encapsulated cargo in microcompartment assembly”, [PLoS Comput Biol](#) **14**, e1006351 (2018).
- [148] F. Mohajerani et al., “Mechanisms of Scaffold-Mediated Microcompartment Assembly and Size Control”, [ACS Nano](#) **15**, 4197-4212 (2021).
- [149] E. Selivanovitch y T. Douglas, “Virus capsid assembly across different length scales inspire the development of virus-based biomaterials”, [Current Opinion in Virology](#) **36**, 38-46 (2019).
- [150] D.-H. Chen et al., “Structural basis for scaffolding-mediated assembly and maturation of a dsDNA virus”, [Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America](#) **108**, 1355-1360 (2011).
- [151] S. Li, P. Roy, A. Travasset y R. Zandi, “Why large icosahedral viruses need scaffolding proteins”, [Proceedings of the National Academy of Sciences](#) **115**, 10971-10976 (2018).
- [152] C. P. Mata et al., “The RNA-Binding Protein of a Double-Stranded RNA Virus Acts like a Scaffold Protein”, [Journal of Virology](#) **92**, 10.1128/jvi.00968-18 (2018).
- [153] V. V. Mesyanzhinov et al., “A proposed structure of bacteriophage T4 gene product 22—a major prohead scaffolding core protein”, [Journal of Structural Biology](#) **104**, 24-31 (1990).
- [154] A. C. Mendes, E. T. Baran, R. L. Reis y H. S. Azevedo, “Self-assembly in nature: using the principles of nature to create complex nanobiomaterials”, [WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology](#) **5**, 582-612 (2013).
- [155] A. O’Neil et al., “Genetically Programmed In Vivo Packaging of Protein Cargo and Its Controlled Release from Bacteriophage P22”, [Angewandte Chemie International Edition](#) **50**, 7425-7428 (2011).
- [156] S. Qazi et al., “Programmed Self-Assembly of an Active P22-Cas9 Nanocarrier System”, [Molecular Pharmaceutics](#) **13**, 1191-1196 (2016).
- [157] D. Patterson et al., “Encapsulation of Pseudomonas aeruginosa elastase inside the P22 virus-like particle for controlling enzyme–substrate interactions”, [Biotechnology Journal](#) **17**, 2200015 (2022).
- [158] M. G. Mateu, “Assembly, Engineering and Applications of Virus-Based Protein Nanoparticles”, en [Protein-based Engineered Nanostructures](#), ed. por A. L. Cortajarena y T. Z. Grove (Springer International Publishing, 2016), págs. 83-120.

- [159] L. Dagdug, J. Peña e I. Pompa-García, *Diffusion Under Confinement: A Journey Through Counterintuition* (Springer Nature: Cham, Switzerland, 2024).
- [160] J. Peña, D. Hernandez, L. Dagdug y D. Reguera, “Autoensamblaje de Cápsides Virales: Teoría y Simulación”, [Contactos, Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería, En proceso de publicación \(2024\)](#).
- [161] J. Peña, L. Dagdug y D. Reguera, “On the influence of bending energy on the assembly of spherical viral capsids”, [The Journal of Chemical Physics](#) **163**, 055101 (2025).
- [162] J. Peña, L. Dagdug y D. Reguera, “Minimum theoretical model of viral capsid self-assembly on a spherical scaffold”, [J. Chem. Phys.](#) **163**, 205101 (2025).

Índice alfabético

Symbols

Iridovirus de Wiseana (IVW), 77
Virus Diminuto de Ratón (VDR), 77
Virus de la Hepatitis B (VHB), 77
Virus de Leucemia Murina (VLM), 77
Virus del Moteado Clorótico del
 Caupí (VMCC), 77
Virus de la Enfermedad de Bursitis
 Infeciosa (VEBI), 85
Virus de la Hepatitis B (VHB), 7
Virus del Herpes Simple 1 (VHS-1), 85
Virus del Herpes Simple (VHS), 7
Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), 1
Virus del Mosaico del Bromo (VMB), 7
Virus del Moteado Clorótico del
 Caupí (VMCC), 2, 7
Virus del Mosaico del Tabaco (VMT), 2, 7
Virus *Penicillium chrysogenum* (VPc), 9
Virus del Papiloma Humano (VPH), 7, 40
Virus de Simio 40 (VS40), 5, 7, 78

A

Adenosín Trifosfato (ATP)
 hidrólisis, 7
agentes
 caotrópicos, 18
agregado, 4, 9, 25, 35, 40, 81, 88
análisis dimensional, 20
aproximación de Strirling, 11
autoensamblaje
 autolimitante, 40
 cápsides vacías, 2, 7, 16, 24, 25, 39, 87
 cápsides virales, 2, 7, 8, 24, 37, 39, 111,
 113
 virus, 7, 37, 115

B

bacteriófago, 39
 $\phi 12$, 7
 $\phi 29$, 7
 $\phi 6$, 7
 Hong Kong 97, 9

P22, 85

T4, 85

balance detallado, 27, 28, 65

barrera de energía, 4, 8, 21, 22, 33, 34, 40, 48,
 56, 75, 80, 86, 87, 92, 100, 113, 115

escalada, 96

biofísica, 16

C

capsómeros, 2, 7–9, 78

celdas de agregación, 10

cinética

 de autoensamblaje, 24, 41, 62, 80, 100,
 113

coeficiente

 de Poisson, 84

compresión

 plano, 4, 40, 42

concentración

 sal, 18, 39, 40, 81, 113

 umbral (concentración crítica), 17, 18

condiciones

 equilibrio, 28, 48, 97

 a la frontera, 29, 34, 65, 72, 76

 ambientales, 8, 40, 48, 76, 88, 109, 112,
 113

 equilibrio termodinámico, 13

 experimentales, 10, 15, 83

 fisiológicas, 7, 83

 saturación, 37

 subsaturación, 34

 supersaturación, 32

constante

 de energía de borde, 20, 48, 89

 de equilibrio, 15

 de flexión, 48, 91

corriente de agregados, 27

cosmología, 16

cristalización, 2, 7, 39

curva sigmoidal, 24

curvatura

- instantánea, 42, 86
- preferencial, 42, 46, 86, 88
- cápside, 1, 7, 39, 85, 113
 - esférica, 5, 10, 42
 - icosaédrica, 7
 - nativa, 53, 88
 - virales, 2, 8, 39, 83, 85, 113
- cápsides
 - esféricas, 115
 - tubulares, 115
- célula, 1, 39
- D
- desaparición del punto crítico, 59
- desensamblaje, 24, 33
 - de cápsides virales, 16, 76
- diagrama de fase de autoensamblaje, 102
- difusión, 32, 39
- dispersión de luz, 24
- dímeros, 9, 25, 77, 78
- E
- ecuación
 - de Gibbs-Thompson, 36
 - maestra, 26, 34, 63
- eigenvalores, 69
- eigenvectores, 69
- embrión, 9, 43, 88
- empaquetamiento ácidos nucleicos, 7, 39
- energía
 - de adsorción, 88
 - de agregación (unión), 44
 - de borde, 17, 41, 44, 46, 60, 78, 88
 - de enlace efectiva por subunidad, 3, 15, 78, 79, 89, 101
 - de flexión, 37, 40, 42–44, 62, 113
 - de unión (agregación), 18, 40, 43, 44, 88, 90
 - elástica, 4, 40, 42, 43
 - escalada, 48
 - interna, 14, 41
 - tensión lineal, 44
 - térmica, 24
- energía libre, 35
 - de Gibbs, 15, 16, 18, 44, 86
 - escalada, 45, 48
 - de Helmholtz, 13, 14
 - escalada, 90
 - de cierre, 54
 - total, 16
- ensamblaje
 - autolimitante, 44
- ensamble, 10
 - canónico, 12
- entropía, 14
 - configuracional, 8
- envoltura
 - membranosa (lipídica), 1
- equilibrio termodinámico, 14
- espectro de agregación, 10
- estado
 - de desensamblaje, 14
 - de ensamble, 14
 - de equilibrio, 22, 60
 - de supersaturación, 22, 23
 - estacionario, 25, 30, 65
- estadísticamente independiente, 11
- F
- factor
 - de escalamiento, 91
 - de Zeldovich, 31, 100
- fase
 - extracelular, 1
- fotodiodo de cuadrante, 83
- fracción de concentración, 17
- frecuencia de transición, 32
- frontera de estabilidad, 54
- fuerza iónica, 40
- función
 - de estado, 10, 13, 14
 - de partición, 10
- G
- gas
 - ideal, 27
- genoma, 39
- grados de libertad, 12, 41
- H
- hexámeros, 9
- histéresis, 24, 33, 40, 76
- I
- in vitro, 25, 36, 39
- indentación, 83
- inmunogénico, 78
- interacciones

- agregado-subunidad, 10
 - andamiaje-subunidad, 85, 88
 - eléctricas, 8
 - eléctrostáticas, 3
 - genoma-subunidad, 85
 - hidrofóbicas, 3, 8
 - molde-capsómero, 88
 - molde-subunidad, 88, 89
 - subunidad-subunidad, 10, 42, 85, 88
 - van der Waals, 3, 8
- iones, 18
- L
- ley de acción de masas, 14–16, 25
- M
- macroestado, 10
- material genético, 1, 2
- matriz
- de crecimiento, 66
 - identidad, 69
- membrana, 43
- micela, 7
- microcompartimentos bacterianos, 83, 85
- microestado, 10
- microscopio
- de fuerza atómica, 83
 - de túnel de barrido, 83
- modelo clásico, 97
- molaridad
- agua pura, 15
- molde esférico, 87
- moléculas, 35
- motores moleculares, 7
- multiplicadores indeterminados de Lagrange, 11
- máximo global, 55
- módulo
- de flexión, 43, 77, 84, 89
 - de Young, 83
 - bidimensional, 84
 - tridimensional, 84
- N
- nanocontenedores, 83
- nanoindentación, 83
- nucleación, 2, 7, 16, 35, 85
- núcleo, 9, 42, 43, 88
- crítico, 22, 40
- número
- crítico de agregación, 21, 40
 - de agregación, 10
 - preferencial, 42, 88, 101
 - de cierre, 46, 93
 - escalado, 46, 93
 - de Föppl-von Kármán, 42, 84
 - de subunidades
 - escalado, 57 - instantáneo de subunidades, 20, 41, 88
 - escalado, 45
- P
- paisaje de energía
- escalada, 50
- penalización entrópica, 16
- pentámeros, 9, 25
- periodo de retraso (ver tiempo de nucleación), 24
- pH, 18, 40, 88
- plexiglas, 83
- polietileno, 83
- poliomavirus, 78
- potencial de Lennard-Jones, 89
- potencial químico, 9, 14, 17, 18, 23, 35, 89
- de adsorción, 89
 - mezcla ideal, 15
- principal proteína de la cápside, 78
- principio de cuasi-equivalencia, 10
- Proteína Viral 1 (PV1), 78
- proteína, 13
- andamiaje, 85
 - de andamiaje, 7
- R
- radio
- de cierre, 50
 - de cierre escalado, 50
 - de curvatura
 - preferencial, 42, 87 - instantáneo de curvatura, 42, 43
- reacciones
- unimoleculares, 27
- ritmo
- asociación, 24
 - desenjamblaje, 34
 - disociación, 24
 - nucleación (tasa de nucleación), 24, 28, 30, 31, 34, 40, 42, 62, 86

- reacción, [25](#)
- separación, [26](#), [28](#)
- unión, [26](#)
- régimen de estabilidad, [54](#)
- S
- SARS-CoV-2, [1](#)
- serie
 - Taylor, [23](#), [30](#)
 - telescópica, [29](#)
- simulación computacional, [8](#), [37](#), [42](#), [87](#)
- sistema
 - bicomponentes, [65](#)
 - polidisperso, [10](#)
- subunidades, [9](#), [25](#)
 - libres (proteicas), [40](#), [85](#)
 - proteicas, [7](#), [9](#), [39](#), [42](#), [85](#), [87](#)
- supersaturación, [21](#), [48](#), [91](#)
 - efectiva escalada, [93](#)
 - pseudo, [46](#)
- Supersaturación Mínima de Frontera (SMF),
[54](#), [91](#)
- Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, [1](#)
- T
- tamaño crítico
 - de agregación (nucleación), [21](#), [34](#), [40](#)
- temperatura, [18](#)
- tensión
 - lineal, [15](#), [17](#), [20](#), [40](#), [42](#)
 - superficial, [17](#)
- tensión lineal
 - escalada de la cápside, [45](#)
- teorema de nucleación, [35](#)
- teoría
 - agregación de Smoluchowski, [28](#)
 - autoensamblaje en equilibrio, [8](#)
 - elasticidad, [42](#)
 - elasticidad continua, [42](#)
- Teoría Clásica de Nucleación (TCN), [35](#), [40](#)
 - sistemas multicomponentes, [62](#)
- Teoría de Cáscaras Delgadas, [84](#)
- terapia genética, [2](#), [78](#)
- termodinámica, [14](#)
- temperatura, [40](#)
- tiempo de nucleación (tiempo de retraso), [24](#),
[32](#)
- transición de fase, [7](#), [9](#), [24](#)
 - primer orden, [16](#), [37](#)
 - vapor-líquido, [17](#)
- trayectoria
 - de compresión, [50](#)
- Trayectoria de Mínima Energía (TME), [45](#),
[48](#), [49](#), [91](#)
- turbidimetría, [24](#)
- V
- valores preferenciales, [53](#), [88](#)
- virión, [7](#)
- virión (viriones), [1](#), [85](#)
- virología, [2](#)
 - aplicaciones, [2](#)
- virología física, [2](#), [7](#)
- Virus, [1](#), [7](#)
 - maduración, [39](#)
- Virus Genoma de cadena simple (Gcs), [7](#)



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00146

Matrícula: 2222800162

Virología Física: Teoría de Autoensamblaje de Cápsides Virales.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 29 del mes de octubre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. GUSTAVO ADOLFO CHAPELA CASTAÑARES
DR. CARLOS IGNACIO MENDOZA RUIZ
DR. LEONARDO DAGDUG LIMA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA)

DE: JASON BRANDON PEÑA MUÑOZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

Roman Linares Romero
DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE

DR. GUSTAVO ADOLFO CHAPELA
CASTAÑARES

VOCAL

DR. CARLOS IGNACIO MENDOZA RUIZ

SECRETARIO

DR. LEONARDO DAGDUG LIMA