



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
Ciencias e Ingeniería

Dinámica esencial y canalización estructural inducida en las variantes
de SARS-CoV-2

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

AUTOR

MSc. Maurizio Martin Cavani Brain

ASESOR

Dr. Walter Arnaldo Riofrio Rios

LIMA- PERÚ

2026

Jurado Calificador

Presidente: Dr. Jorge Enrique Rodriguez Bailon

Secretario: Dr. Willy Manuel Ceron Tello

Vocal: MSc. Marco Antonio Isaias Cabello Napuri



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	CAVANI BRAIN MAURIZIO MARTIN

(Agregar filas adicionales si hay más autores)

Pertenecientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA** autores del trabajo titulado: **Dinámica esencial y canalización estructural inducida en las variantes de SARS-CoV-2** el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	Riofrio Rios Walter Arnaldo	FACI	ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **8%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **36781G8586**; fecha de entrega: **13/10/2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 13 de octubre de 2026**


Firma del asesor
N° DNI: 08699121
ORCID: 0000-0002-7304-6072

DEDICATORIA

A mis padres, Hugo y Roxanna, y a Renzo y Gabriella, por su constante e invaluable apoyo... a pesar de todo.

AGRADECIMIENTOS

Al “doc” Marcelino Arciniega por enseñarme e incorporarme a su equipo de investigación entre el 2020 y 2022, y por haberme permitido trabajar en su laboratorio en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Sin esos conocimientos no habría sido posible formular el proyecto sobre el cual versa esta tesis.

Al PhD. Leonardo Tafolla, por la revisión, edición y comentarios al presente trabajo.

A Darinka Nestorovic, sin su apoyo constante no habría sido posible concluir este proyecto.

A Renzo Cavani, por su apoyo incondicional en la edición de la versión final de la tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
2.1. Hipótesis	6
2.2. Objetivo Principal	6
2.3. Objetivos Específicos	7
III. METODOLOGÍA	7
3.1. Dinámica molecular	7
3.2. Análisis estructural de las trayectorias.....	10
3.3. Análisis de componentes principales	11
IV. RESULTADOS	12
4.1. Análisis de las simulaciones de dinámica molecular.....	12
4.2. Análisis de componentes principales	21
V. DISCUSIÓN	25
VI. CONCLUSIONES	27
VII. COMENTARIOS FINALES	29
VIII. DATA DISPONIBLE	30
IX. LIMITACIONES	31
X. FUENTES DE FINANCIAMIENTO	32
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

RESUMEN

Desde su aparición, el virus SARS-CoV-2 ha demostrado una notable resiliencia genética y capacidad de adaptación, acumulando mutaciones en el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína spike modificando la dinámica estructural de esta proteína sin comprometer su función.

El presente trabajo se realizó en este marco, habiendo finalizado la pandemia de COVID-19 y con las dudas que surgieron sobre la historia evolutiva del virus. Para ello se realizaron simulaciones de dinámica molecular de la proteína spike de cinco variantes de interés: WuhanHu-1, alpha, gamma, delta y omicron BA.1. Posteriormente, se hizo un análisis estructural de la interfaz de interacción y la dinámica esencial con un análisis de componentes principales (PCA) para explorar la estabilidad, flexibilidad y modos de movimiento de la proteína en cuestión. El objetivo del trabajo consistió en identificar patrones de reorganización, la dinámica colectiva y los modos de movimiento, que expliquen la capacidad del virus para mantener la función pese a la acumulación de mutaciones. Los resultados mostraron que la proteína se mantiene estable, aunque existen diferencias locales: la variante alpha reorganiza la red de interacciones gracias a la mutación N501Y, la variante gamma (K417T) y la variante delta (L452R y T478K) pierden interacciones críticas y la variante omicron BA.1 compensa la pérdida de contactos con la aparición de nuevas interacciones polares (Q493R con E35 y Q498R con D38). El análisis de PCA confirmó que el complejo wild type y gamma concentran la varianza, mientras que las otras variantes dispersan la varianza debido a la complejidad estructural.

En conjunto, los resultados del presente trabajo evidencian que existe un proceso de canalización estructural inducido por mutaciones y epistasis intramolecular (mutaciones compensatorias), donde las mutaciones permiten una reorganización asegurando su apropiada, desde el punto de vista de supervivencia del virus, interacción con los receptores en la célula del huésped.

PALABRAS-CLAVE:

SARS-COV-2; proteína spike; mutaciones; dinámica esencial; epistasis intramolecular; canalización estructural inducida.

ABSTRACT

Since its emergence, the SARS-CoV-2 virus has demonstrated remarkable genetic resilience and adaptability, accumulating mutations in the receptor-binding domain (RBD) of the spike protein that modify the structural dynamics of this protein without compromising its function.

The present work was carried out within this framework, after the end of the COVID-19 pandemic and in light of the questions that arose regarding the evolutionary history of the virus. To this end, molecular dynamics simulations were performed on the spike protein of five variants of interest: WuhanHu-1, alpha, gamma, delta, and omicron BA.1. Subsequently, a structural analysis of the interaction interface and essential dynamics was conducted using principal component analysis (PCA) to explore the stability, flexibility, and modes of motion of the protein in question. The aim of the study was to identify patterns of reorganization, collective dynamics, and modes of motion that explain the virus's ability to maintain function despite the accumulation of mutations. The results showed that the protein remains stable, although local differences exist: the alpha variant reorganizes the interaction network thanks to the N501Y mutation; the gamma variant (K417T) and the delta variant (L452R and T478K) lose critical interactions; and the omicron BA.1 variant compensates for the loss of contacts through the emergence of new polar interactions (Q493R with E35 and Q493R with D38). PCA analysis confirmed that the wild-type complex and gamma concentrate the variance, while the other variants disperse the variance due to structural complexity.

Taken together, the results of this work provide evidence of a process of structural canalization induced by mutations and an intramolecular epistasis (compensatory mutations), in which mutations enable a reorganization that ensures, from the perspective of viral survival, appropriate interaction with host cell receptors.

KEYWORDS:

SARS-CoV-2; spike protein; mutations; essential dynamics; intramolecular epistasis; mutation-induced structural canalization.

I. INTRODUCCIÓN

A poco más de seis años desde el inicio de la pandemia de COVID-19, aún persisten muchas incógnitas sobre el veloz proceso evolutivo del virus SARS-CoV-2. El mecanismo de infección fue ampliamente caracterizado durante los dos primeros años, entre 2020 y 2022, mediante técnicas como la difracción de rayos X y la criomicroscopía electrónica (1-4). En ese periodo, surgieron múltiples variantes que comprometieron la capacidad de respuesta de los sistemas de salud pública en la mayoría de países en el mundo, especialmente en países en vías de desarrollo (5-6). Estas nuevas variantes se adaptaron a las estrategias de los sistemas de salud para controlar la propagación del virus—incluyendo anticuerpos monoclonales, antivirales y vacunas—manteniendo su transmisibilidad y perfeccionando los mecanismos de evasión inmunológica (7-12). Aunque no se observaron mejoras significativas en la patogenicidad del virus, las mutaciones en respuesta a tratamientos demostraron una notable resiliencia genética y plasticidad del virus, permitiendo su persistencia hasta la actualidad.

El mecanismo de infección del SARS-CoV-2, ampliamente estudiado desde sus inicios, consiste en la entrada del virión mediante la interacción entre el dominio de reconocimiento del receptor (RBM, por sus siglas en inglés) de la subunidad S1 de la proteína spike (proteína espiga)—llamada así por su apariencia en la cápside viral—y la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (hACE2, por sus siglas en inglés) (1, 3). Esta interacción depende de tres regiones clave: una zona de anclaje en el residuo N501, que inicialmente formaba puentes de hidrógeno y luego, tras una mutación a tirosina (menos en la variante delta), pasó a una interacción π - π más fuerte y estable (13); una región complementaria en el flanco opuesto del RBM, en el residuo K417 (que muta por asparagina en la variante beta y el linaje omicron, y por treonina en la variante gamma), que formaba un puente salino con D30 (presente en la variante Wuhan-Hu-1 y en la variante delta), posteriormente reemplazada por residuos más cortos que modificaron la distancia intermolecular y facilitaron el contacto del loop que contiene al residuo E484 (que muta por lisina en la variante beta y gamma, y por alanina en el linaje omicron) mediante puentes de hidrógeno (14); y finalmente, una glicosilación en el residuo N343, que estabiliza la estructura del RBM y participa activamente en la interacción con hACE2 (15). A partir de este conocimiento, se diseñaron tratamientos que inicialmente prometían resultados, pero la evolución viral impidió su eficacia y fueron retirados (16).

Durante la pandemia, los esfuerzos del personal de salud fueron constantes, aunque enfrentaron cambios abruptos y múltiples fracasos. Finalmente, se logró contrarrestar al virus mediante la fabricación de vacunas más sofisticadas, alcanzando una reducción sustancial de enfermedad grave debido a una protección casi completa frente a nuevas variantes y llevando la pandemia hacia una fase endémica (17-19). En 2023 se declaró oficialmente su fin, y la vida retornó a una cuasi-normalidad (20). Sin embargo, para quienes estudiamos al SARS-CoV-2, surgieron muchas preguntas abiertas. Este virus no se parece a los anteriores coronavirus, dado que su fácil transmisión aérea y la exposición a diferentes poblaciones —con sus respectivos sistemas inmunes— le permitió evolucionar rápidamente en cuestión de meses, adaptándose a entornos cambiantes mediante mecanismos intramoleculares como el ligamiento intragénico y la epistasis intramolecular, que modificaron la estructura del RBM sin afectar su transmisibilidad— manteniendo casi intacta la constante de disociación (en el rango de 4-15 nM, según la metodología experimental que se utilice para la medición) en la interacción con hACE2 (21-24). Como ejemplo de robustez y mejora en la aptitud genética, no hay precedentes similares. Por ello, el estudio de su evolución continúa—quizás con menor intensidad, pero con igual interés—para comprender, desde la ciencia básica, de qué es capaz la naturaleza.

Los mecanismos de ligamiento intragénico y epistasis intramolecular, mencionados anteriormente, representan una novedad para quienes estudian biología evolutiva en virus. Esto se debe a la escasa evidencia de mutaciones puntuales producidas en el proceso de reproducción del virus al interior de la célula del huésped, que además se validen en corto tiempo y permitan una rápida adaptación a los tratamientos. Para que esto ocurra, se requiere un mecanismo mutagénico capaz de editar el material genético en respuesta a cambios en el microambiente del hospedero, un tema aún poco explorado. Lo que sí se ha observado es un mecanismo de epistasis intramolecular entre residuos distantes, que compensan cambios en la energía libre de interacción con el fin de asegurar la persistencia viral. Este mecanismo no solo conecta aminoácidos lejanos en secuencia y estructura, sino que también influye en la red energética, permitiendo que el virus evolucione bajo presión de selección y prevalezca por la selección natural.

La robustez estructural de una proteína depende de parámetros definidos por sus interacciones intramoleculares—como la estabilidad del núcleo o *core*—y sus

interacciones con la proteína receptora. Esto exige al virus que, a nivel genético, prevalezcan patrones mutacionales que no limiten el proceso evolutivo, sino que lo favorezcan. En el caso del SARS-CoV-2, las variantes han seguido esta ruta, acumulando mutaciones que han permitido al virus establecerse en una fase endémica, coexistiendo con hospederos vacunados y causando enfermedades leves o moderadas (25). Aunque esto no descarta una futura pandemia causada por una variante más infecciosa, por ahora es posible convivir con el coronavirus en su estado actual.

Con el objetivo de destacar algunos aspectos clave de la proteína spike—a nivel intramolecular y en el contexto de la evolución viral—desde la variante wild-type hasta la variante omicron BA.1, es fundamental considerar que el proceso evolutivo ha estado marcado por cambios en la dinámica estructural (26). Esta dinámica se refiere al movimiento de la proteína en respuesta a su interacción con el receptor. La proteína spike se caracteriza por tener loops esenciales en la región más externa del RBM, responsables de la interacción con hACE2, que presentan modos de movimiento en tiempos específicos. Aunque existen estudios estructurales, biofísicos y computacionales sobre la interacción entre el sitio de unión al receptor y la proteína hACE2 en las variantes de SARS-CoV-2, aún falta integrar de manera sistemática la dinámica esencial, la distribución de los modos conformacionales, los cambios energéticos y epistasis intramolecular bajo un marco comparativo de canalización estructural entre variantes. Una manera de abordar un estudio de este tipo, es a través de simulaciones computacionales prolongadas observando el comportamiento de las variantes de la proteína. Estos movimientos, correlacionados con los cambios en la energía libre y la transmisibilidad, requieren una caracterización exhaustiva mediante análisis multivariado. Este aspecto aún no ha sido estudiado en profundidad y permanece como una incógnita clave para entender: ¿cómo ocurre la epistasis intramolecular?.

Para abordar esta pregunta, revisando la literatura actual, es pertinente mencionar el concepto de “canalización”. Este término, introducido por Waddington en 1942, se refiere a la tendencia de generar fenotipos estables durante la evolución (27). Aplicado al nivel intramolecular, sugiere que las variaciones que prevalecen tienden a favorecer la estabilidad estructural y funcional, permitiendo el proceso de selección natural hacia la supervivencia del más apto. Basado en este concepto y considerando el cambio provocado por las mutaciones y el entorno, este proyecto busca desentrañar el efecto de las

mutaciones sobre los movimientos de la proteína, para inferir sobre la epistasis intramolecular y la canalización estructural de la proteína spike.

La dinámica esencial —definida como el estudio de los modos de movimiento fundamentales de un sistema biológico— se abordará en dos etapas: primero, mediante simulaciones de dinámica molecular (MD, por sus siglas en inglés) de las variantes de interés—conocidas como VoC's (Variants of Concern, por sus siglas en inglés)—Wuhan-Hu-1, alpha, gamma, delta y omicron BA.1; luego, con un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para explorar la varianza e identificar los modos de movimiento esenciales de la proteína (28-29). Así, se espera obtener información suficiente para —sumado al estudio termodinámico previo en la variante gamma— esclarecer cómo ocurre la epistasis intramolecular en las diferentes variantes del coronavirus (24).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Las mutaciones acumuladas en la proteína spike del SARS-CoV-2, desde la variante Wuhan-Hu-1 hasta Omicron BA.1, podrían influir en fenómenos como la canalización estructural y la epistasis intramolecular. Estos procesos, en conjunto, habrían contribuido a que el virus conserve su capacidad de unión al receptor hACE2 y mantenga la transmisibilidad. Asimismo, es posible que dichos cambios se reflejen en la dinámica esencial de la proteína, donde los modos de movimiento fundamentales compensen variaciones energéticas y favorezcan la persistencia viral bajo presión de selección.

2.2. Objetivo Principal

Caracterizar la dinámica esencial de la proteína spike del SARS-CoV-2 en diferentes variantes de preocupación (WT, Alpha, Gamma, Delta y Omicron BA.1), mediante simulaciones de dinámica molecular y análisis de componentes principales, para comprender el papel de la epistasis intramolecular en la evolución del virus.

2.3. Objetivos Específicos

- Realizar simulaciones de dinámica molecular (MD) prolongadas de las variantes seleccionadas de la proteína spike, con el fin de obtener trayectorias representativas de su comportamiento estructural.
- Evaluar la influencia de mutaciones clave en la estabilidad estructural y en la interacción con hACE2.
- Aplicar análisis de componentes principales (PCA) sobre las trayectorias de MD para identificar los modos de movimiento esenciales y comparar la varianza entre variantes de SARS-CoV-2.
- Inferir sobre un mecanismo de epistasis intramolecular a partir de la compensación energética entre residuos distantes, determinando cómo estos ajustes favorecen la canalización estructural y la persistencia viral.

III. METODOLOGÍA

La metodología se articuló linealmente en tres fases: primero, la dinámica molecular, entendida como la simulación computacional de las ecuaciones de movimiento de Newton para obtener trayectorias atómicas; luego, el análisis estructural de trayectorias, que convierte las trayectorias en descriptores geométricos y de estabilidad como RMSD o RMSF; y, finalmente, el análisis de componentes principales, que aplica reducción estadística de dimensionalidad para identificar los modos colectivos dominantes y simplificar la descripción de la dinámica conformacional.

3.1. Dinámica molecular

Las estructuras tridimensionales del dominio de unión al receptor (RBD o receptor binding domain, por sus siglas en inglés) de la proteína spike del SARS-CoV-2,

correspondientes a las VoC's fueron obtenidas del Protein Data Bank (PDB) (tabla 1). Las estructuras fueron escogidas debido a que los valores de resolución y R-free cumplen con los estándares mínimos para hacer dinámica molecular.

Parámetro de validación estructural	Variante				
	Wild type	Alpha	Gamma	Delta	Omicron BA.1
PDB ID	6m0j	7ekf	7ekc	7wbq	7wbp
Resolución	2.45	2.85	2.80	3.34	3.00
R-free	0.277	0.224	0.225	0.226	0.204
Mutaciones		N501Y	N501Y, K417T y E484K	L452R y T478K	K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y y Y505H

Tabla 1: Parámetros de validación estructural (resolución y R-free) para evaluar la calidad del modelo atómico de las cinco VoC's obtenidas del PDB.

Para el análisis estructural, todos los RBD de las variantes fueron desacoplados de los anticuerpos y del receptor hACE2. Asimismo, fueron eliminadas las moléculas de agua, glicosilaciones y los átomos de hidrógeno presentes en las estructuras cristalográficas, conservando únicamente en hACE2 los cofactores iónicos estructurales identificados: zinc y cloro. Los complejos entre cada variante y el receptor hACE2 fueron reconstruidos mediante alineamiento estructural de los átomos C- α , tomando como referencia el complejo 'wild-type' (WT) y superponiendo el RBD de cada variante, utilizando el software PyMOL v.2.0 (30) (figura 1).

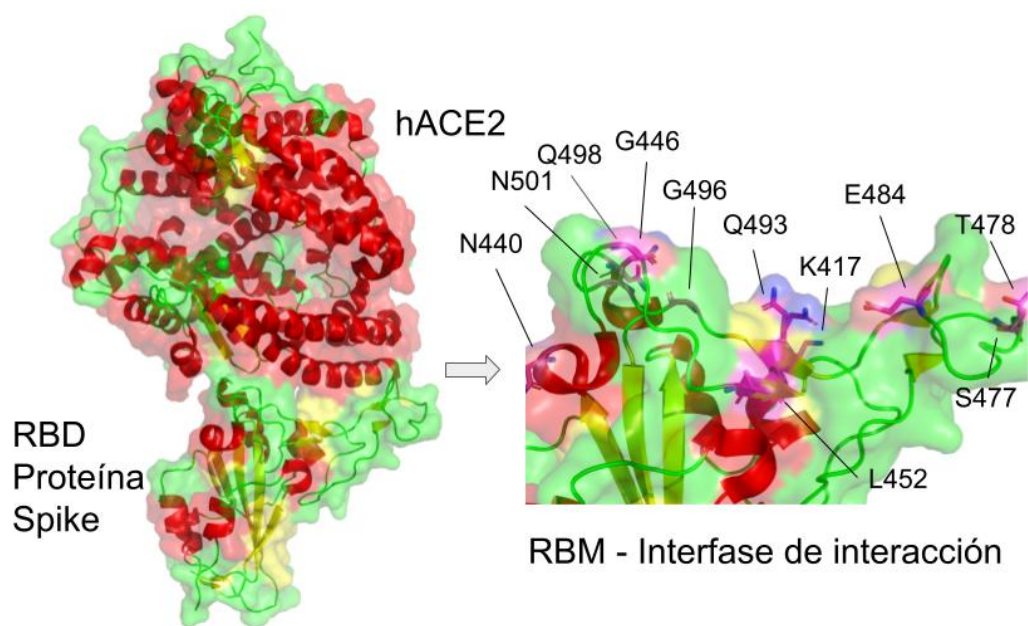


Figura 1: Estructura tridimensional de la proteína spike de la variante wild type en complejo con hACE2 (PDB ID 6m0j). Se muestra el RBD (Receptor Binding Domain, por sus siglas en inglés) y el RBM (Receptor Binding Motif, por sus siglas en inglés) de la proteína spike resaltando los residuos de interés en los cuales ocurren mutaciones en las cinco variantes del estudio: wild type, alpha, gamma, delta y omicron BA.1. *La proteína hACE2 que se muestra en la figura fue utilizada para los alineamientos estructurales debido a que contenía los iones estructurales Cl y Zn en las coordenadas correspondientes.

Posteriormente, los complejos fueron preparados para simulaciones MD, empleando el campo de fuerza Amber99s-idln en el software GROMACS v.2023.3 (31). A través de la herramienta pdb2gmx, las estructuras fueron convertidas al formato compatible con GROMACS para proceder con la simulación.

Los complejos proteicos fueron insertados en una caja de simetría octaédrica con una distancia mínima de 11Å entre los extremos de la molécula y los bordes de la caja en cada dimensión. La solvatación se realizó utilizando el modelo de agua TIP3p. Donde se incorporaron iones de cloruro y sodio, hasta alcanzar una concentración final de 0.150M de NaCl, junto con un excedente de iones para neutralizar la carga neta del sistema.

Todas las simulaciones de MD se ejecutaron bajo condiciones de contorno periódico (*Periodic Boundary Conditions* o PBC, por sus siglas en inglés), lo cual consiste en rodear la caja de simulación con copias idénticas de sí misma para que cuando una molécula cruce un borde de la caja de simulación reaparezca por el lado opuesto, como si el sistema fuera infinito. En primera instancia, se llevó a cabo una minimización de energía de

50.000 pasos utilizando el algoritmo de descenso más pronunciado (*steepest descent*). Posteriormente, se fijó la temperatura en 300K mediante el termostato de Berendsen durante 1ns, aplicando restricciones de posición de $1000\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ sobre los átomos pesados de la proteína. Este procedimiento se repitió una vez más aplicando restricciones sobre la cadena principal (*backbone*) y, finalmente, sobre todo el sistema. A continuación, se realizó una etapa de equilibrio del solvente durante 1.0 ns, seguida por una etapa de equilibrio del sistema completo, con el objetivo de optimizar la solvatación de las cadenas laterales (*sidechains*). Para ello, se utilizó el integrador leap-frog con un paso de integración de 2 fs y un total de 1.0 ns, las salidas de energía y registros se guardaron cada 2 ps y el control de temperatura se realizó con el acoplamiento de Berendsen fijado a 300K. La presión no se acopló.

Una vez completadas estas fases, se ejecutó una etapa final de equilibrio sin restricciones de posición durante 1.0 ns. Durante este periodo, la temperatura y la presión se mantuvieron constantes mediante el termostato de Verlet y el barostato de Parrinello-Rahman, fijados en 300K y 1bar, respectivamente. Finalmente, se llevó a cabo la simulación de producción bajo las condiciones previamente equilibradas, con una duración total de 100ns. Tanto en las etapas de equilibrio como en la producción, se empleó un paso de integración temporal de 2fs. Las energías y coordenadas fueron registradas cada 100ps para su posterior análisis. Las simulaciones fueron visualizadas y analizadas en el software PyMOL v2.5 (20).

3.2. Análisis estructural de las trayectorias

A partir de las trayectorias, se analizaron la desviación cuadrática media (RMSD) y la fluctuación cuadrática media (RMSF). Los cálculos de RMSD y RMSF, fueron hechos para cada proteína spike y receptor hACE2 (*wild-type* y demás variantes de SARS-CoV-2) por separado y en complejo utilizando únicamente C- α . Los análisis RMSD y RMSF, junto con las características geométricas moleculares (puentes de hidrógeno, radio de giro y área accesible al solvente), fueron extraídos de las trayectorias empleando las herramientas de análisis incluidas en el software Gromacs (31). Los cálculos de superficie electrostática se hicieron con el ‘plugin’ APBS de PyMOL (20).

3.3. Análisis de componentes principales

Para caracterizar los cambios conformacionales de la proteína spike del SARS-CoV-2 en las distintas VoC's, tras la interacción con hACE2, se utilizó el método de análisis multivariado PCA sobre las trayectorias obtenidas mediante simulaciones MD, con las herramientas `gmx covar` y `gmx anaeig` del paquete GROMACS (29, 31). Las trayectorias fueron previamente procesadas mediante centrado y remoción de traslación y rotación global utilizando '`gmx trjconv`', con el fin de aislar los movimientos internos relevantes al remover PBC. El análisis se basó en la matriz de covarianza construida a partir de las coordenadas cartesianas de los átomos C- α , para reducir el ruido conformacional y enfocar el estudio en los modos colectivos de la estructura proteica. La matriz de covarianza se calculó sobre estructuras alineadas a la estructura proteica promedio durante los 100 ns de simulación, utilizando el algoritmo de mínimos cuadrados, y considerando únicamente los *frames* correspondientes al estado de equilibrio del sistema, definidos tras la inspección del RMSD y RMSF.

Los vectores propios y valores propios resultantes del análisis fueron generados con '`gmx covar`', empleando el método de diagonalización completa de la matriz de covarianza, y posteriormente analizados con '`gmx anaeig`', donde se proyectaron las trayectorias sobre los primeros componentes principales. Se estableció un umbral de varianza acumulada del 80% para seleccionar los modos relevantes, y se calcularon histogramas de proyección para evaluar la distribución conformacional a lo largo de los modos dominantes. Además, se generaron mapas de desplazamiento por componente mediante la opción '`-extr`' de '`gmx anaeig`', lo que permitió visualizar las conformaciones extremas asociadas a cada vector propio. Las trayectorias proyectadas fueron convertidas a formato compatible con PyMOL mediante '`gmx trjconv`', y visualizadas para identificar desplazamientos estructurales en el dominio de unión al receptor (RBM), con especial atención a regiones de hipervariabilidad y sitios de mutación característicos de cada VoC.

Este análisis permitió una caracterización precisa de los modos de movimiento dominantes en la proteína spike, facilitando la comparación estructural entre variantes y proporcionando una base cuantitativa para el análisis de su dinámica conformacional en el contexto de la interacción con hACE2. Para ello, se calculó la varianza explicada (haciendo referencia a cuánto aporta cada componente individual a la variabilidad) y la varianza acumulada (cuánto aportan juntos los primeros "n" componentes) para describir

la dinámica y comparar variantes. Una varianza explicada alta en el primer componente principal correspondió a un movimiento dominante y una varianza repartida entre los primeros componentes principales correspondió a varios movimientos relevantes y a una mayor complejidad estructural. De esta manera, se pudo explicar la complejidad estructural dependiendo de cuántos modos (componentes) se necesitaron para capturar la dinámica global.

IV. RESULTADOS

4.1. Análisis de las simulaciones de dinámica molecular

Se analizaron los RMSD y RMSF de las variantes simuladas: wild type, alpha, gamma, delta y omicron BA.1. Los gráficos de RMSD para cada proteína spike se observaron simulaciones de MD estables a lo largo del tiempo manteniendo una variación media que no representa cambios significativos en la estructura (figura 2).

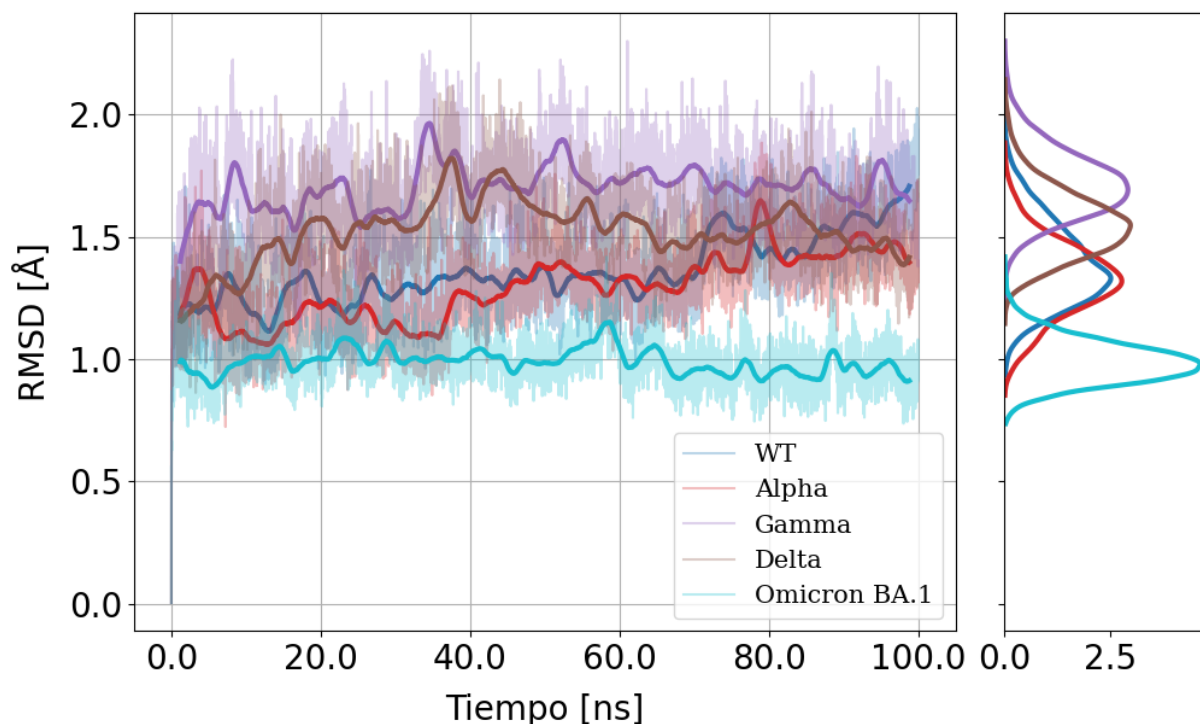


Figura 2: Gráfico de RMSD del RBD la proteína spike de las variantes de SARS-CoV-2: wild type (RMSD = 1.361 ± 0.002 Å), alpha (RMSD = 1.292 ± 0.002 Å), gamma (RMSD = 1.696 ± 0.002 Å), delta (RMSD = 1.516 ± 0.002 Å) y omicron BA.1 (RMSD = 0.988 ± 0.001 Å). La superposición de las curvas de frecuencia representa la estabilidad de las simulaciones. Las líneas graficadas corresponden a los datos reales obtenidos del programa y no a la línea promedio.

En orden de aparición se muestran mayores valores promedio de RMSD que rondan entre 1Å y 2Å. No obstante, se observan superposiciones en las curvas de frecuencia, lo cual indica que no hay diferencias estructurales considerables entre las variantes de estudio. Asimismo, con hACE2 no se observaron cambios globales mayores bajo las condiciones simuladas, salvo en la curva correspondiente al receptor del complejo wild type que muestra dos picos (figura 3). Esa diferencia no representa cambios estructurales en la repetición de la simulación, dado que los cambios en el valor promedio del RMSD no se mueven fuera del rango de 1-2Å, lo que sí podría estar ocurriendo es una estabilización de la proteína en dos pasos.

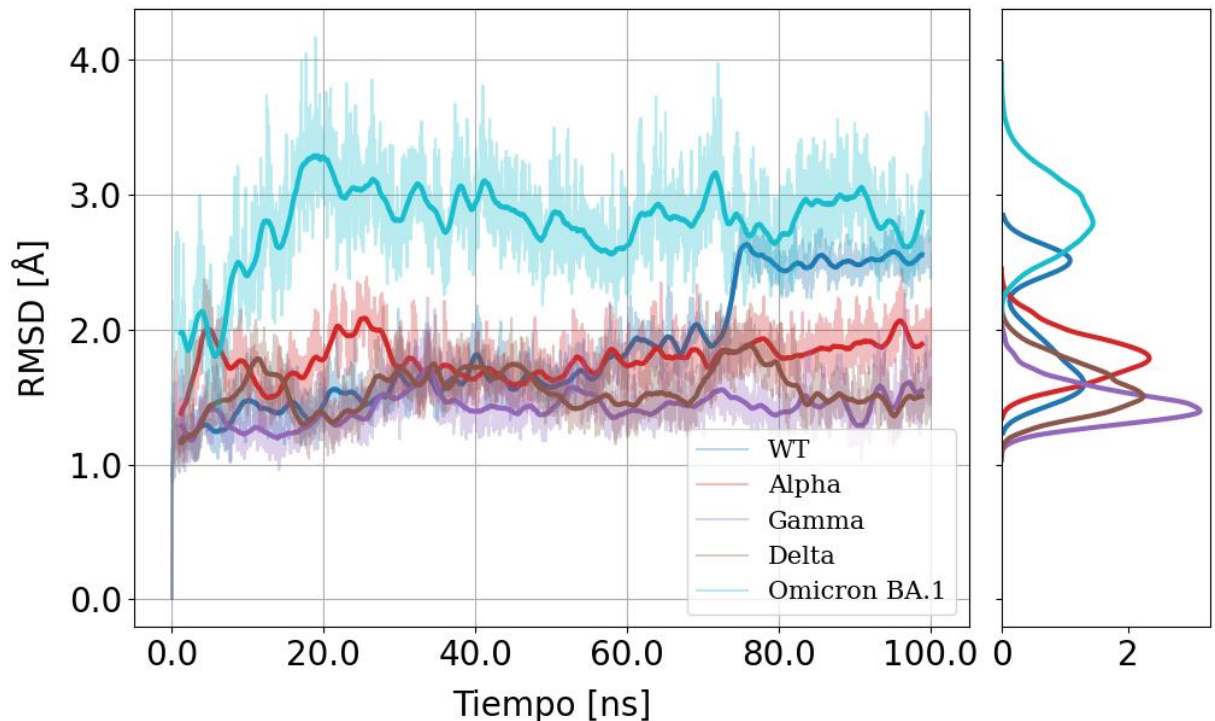


Figura 3: Gráfico de RMSD individual de la proteína hACE2 de las variantes de SARS-CoV-2: wild type (RMSD = 1.841 ± 0.005 Å), alpha (RMSD = 1.779 ± 0.002 Å), gamma (RMSD = 1.418 ± 0.002 Å), delta (RMSD = 1.548 ± 0.002 Å) y omicron BA.1 (RMSD = 2.788 ± 0.004 Å). La superposición de las curvas

de frecuencia representa la estabilidad de las simulaciones. Las líneas graficadas corresponden a los datos reales obtenidos del programa y no a la línea promedio.

Respecto al RMSD en los complejos, se muestra que la simulación se mantuvo estable con variaciones medias que no representan cambios obteniendo valores que se estabilizan a partir de los 20ns (figura 4). En el gráfico se muestran picos en el complejo delta que alcanza los 4Å, correspondiente al reordenamiento de los loops periféricos, pero no representa grandes cambios estructurales. Dado que en la figura 4 se evalúan ambas proteínas en complejo, se observa un promedio entre los 2Å y 4Å manteniendo la estabilidad a lo largo de la simulación. Estas variaciones fueron observadas puntualmente con los gráficos de RMSF que representan las fluctuaciones puntuales del carbono alfa de cada una de las variantes.

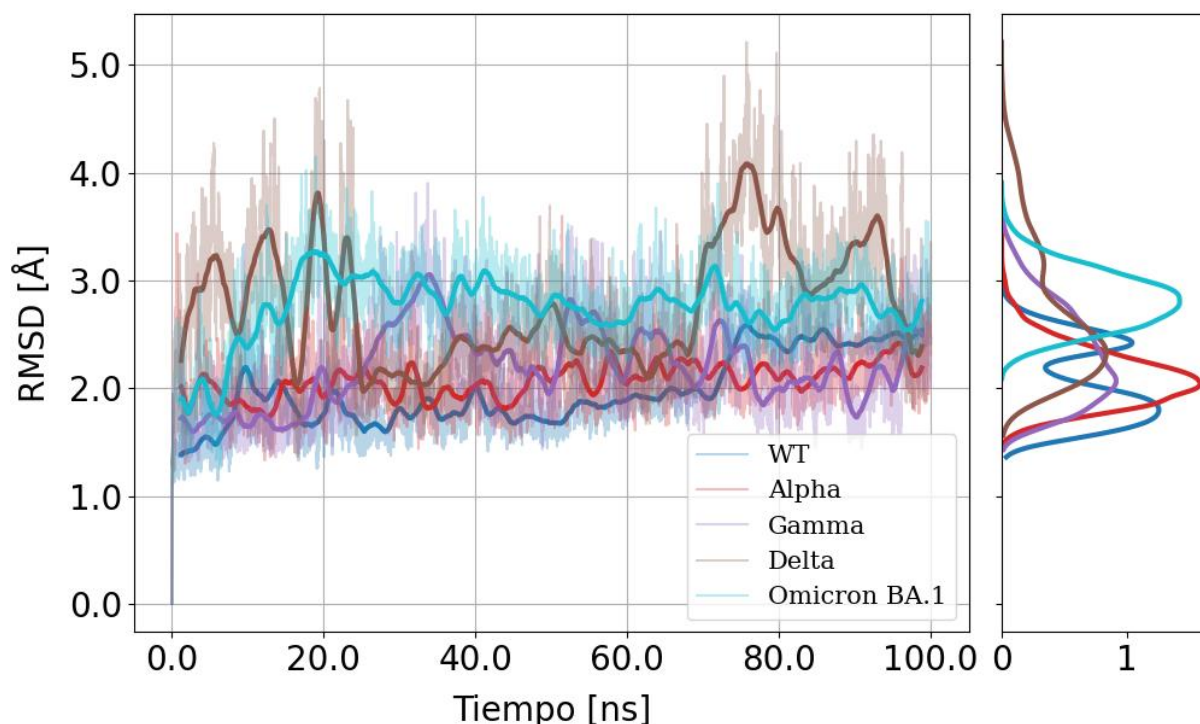


Figura 4: Gráfico de RMSD del complejo de las variantes de SARS-CoV-2: wild type ($\text{RMSD} = 1.979 \pm 0.004 \text{ \AA}$), alpha ($\text{RMSD} = 2.077 \pm 0.003 \text{ \AA}$), gamma ($\text{RMSD} = 2.191 \pm 0.005 \text{ \AA}$), delta ($\text{RMSD} = 2.750 \pm 0.006 \text{ \AA}$) y omicron BA.1 ($\text{RMSD} = 2.759 \pm 0.004 \text{ \AA}$). La superposición de las curvas de frecuencia representa la estabilidad de las simulaciones. Las líneas graficadas corresponden a los datos reales obtenidos del programa y no a la línea promedio.

En los gráficos de RMSF, las fluctuaciones más importantes se observaron en el loop que contiene los residuos S371-F375 de $2\text{-}3\text{ \AA}$ (siendo más prominente en la variante delta), en la variante gamma en el residuo N385 a $2\text{ \AA}$ y para la variante delta entre los residuos N501-Y505 a $2\text{ \AA}$ (figura 5). De estas fluctuaciones, es importante resaltar que el loop S371-F375 y el residuo N385 influyen sobre el reconocimiento por anticuerpos y son altamente flexibles (figura 6a). Ello es de vital importancia ya que afecta directamente a la transmisibilidad de las variantes. Los demás picos que se encuentran en mutaciones de interés para las diferentes variantes del estudio no fluctúan más allá de los $2\text{ \AA}$, lo cual indica que no hay mayores cambios estructurales en la cadena principal.

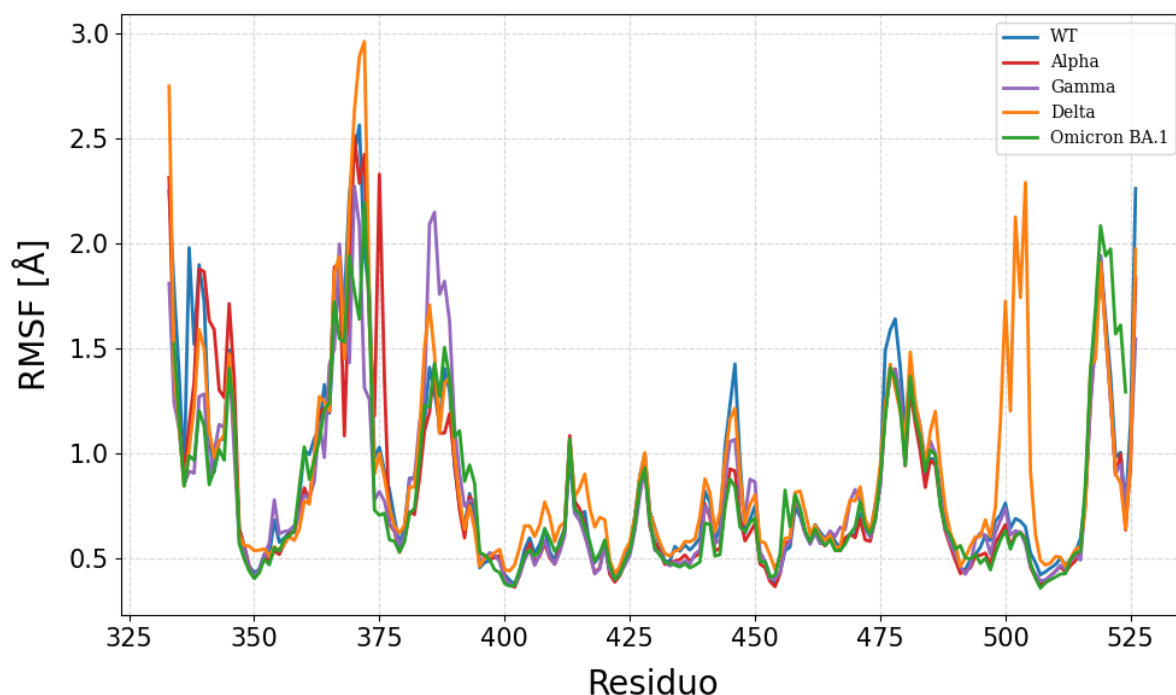


Figura 5: Comparación de fluctuaciones RMSF del RBD de la proteína spike de las variantes de SARS-CoV-2. Las fluctuaciones más prominentes se muestran en el loop S371-F375 y el residuo N385, los cuales participan como blancos antigénicos para anticuerpos neutralizantes.

En la cadena principal del RBD de la proteína spike, se muestra que la región de anclaje pertenece a la interacción entre los residuos N501 (que muta por Y501 en las variantes alpha, gamma y omicron BA.1) dado que esta establece contactos polares por puentes de hidrógeno con los residuos K353 (interacción que se estabiliza por un puente de hidrógeno con D38) y Y41 del receptor hACE2 (figura 6b). Esta también forma puentes de hidrógeno con los residuos Q498 en las variantes wild type y delta. Estos dos contactos entre K353 y Q498 desaparecen por completo con la mutación N501Y en las variantes alpha y gamma (figura 6c). Sin embargo, en la variante omicron BA.1 al mutar Q493R y Q498R se dan dos nuevas interacciones estabilizadoras puentes salinos con E35 y D38 del receptor hACE2 (figura 6d).

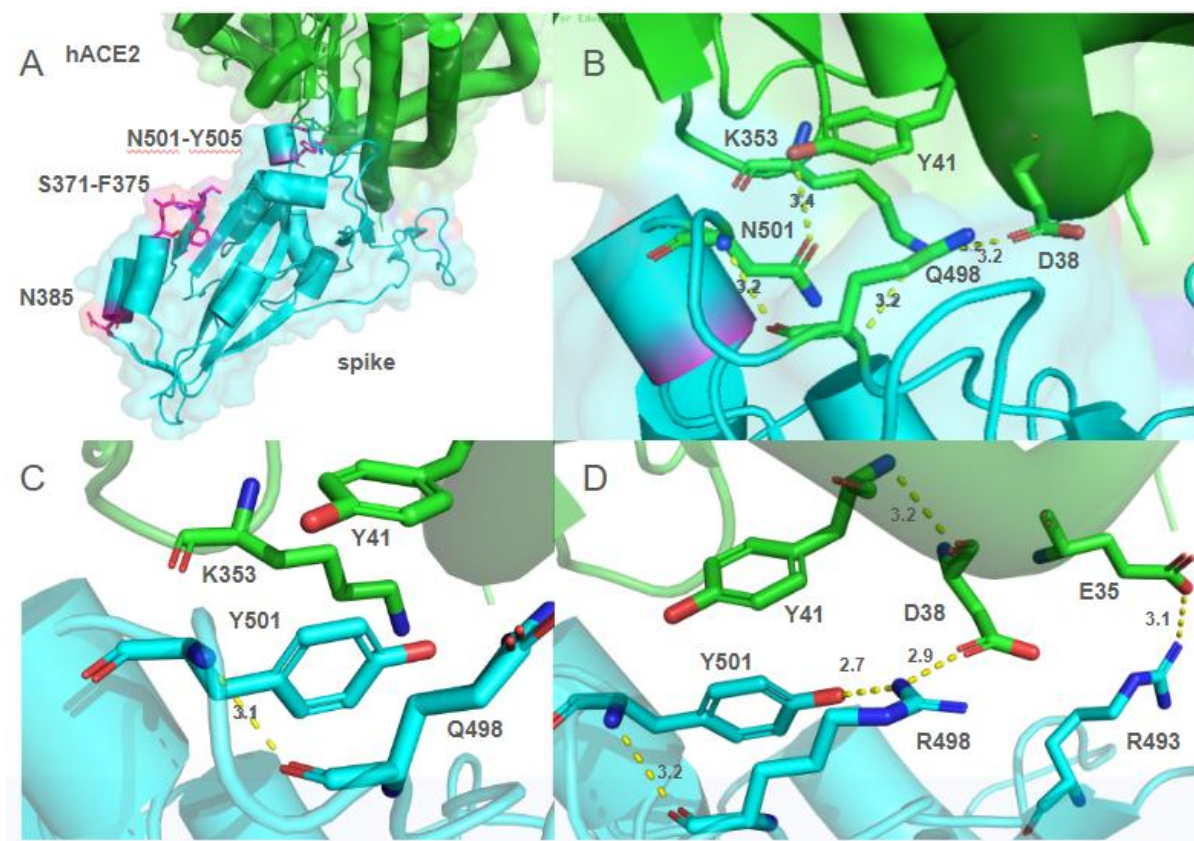


Figura 6: Aspectos estructurales destacados de la proteína spike (celeste) de SARS-CoV-2 en complejo con hACE2 (verde). (A) Regiones calculadas de mayor fluctuación RMSF (PDB ID 6m0j). (B) Puentes de hidrógeno en el complejo WT (PDB ID 6m0j) entre los residuos N501 con Y41 (3.4Å) y Q498 (3.2Å), Q498 estabiliza la interacción de N501 al interactuar con D38 (3.2Å) y K353 (3.2Å). (C) Puente de hidrógeno entre Q498 y Y501 (3.1Å) que estabiliza la interacción hidrofóbica π - π entre Y501 y Y41 (4.5-5.5Å) (24), se pierde la interacción polar entre Q498 y K353 en la variante alpha y gamma (PDB ID 7ekc). (D) Puentes salinos entre D38 y R498 (2.9Å), entre E35 y R493 (3.1Å), y la interacción hidrofóbica π - π entre Y501 y Y41 (4.5-5.5Å) en la variante omicron BA.1 (PDB ID 7wbp).

En la variante gamma, la mutación E484K resulta en una mejora en la afinidad electrostática entre ambas proteínas en complejo al ser el complemento electrostático con su contraparte (residuos E35 y E75) en hACE2. Asimismo, en las variantes alpha, gamma y omicron BA.1, como compensación se observó la interacción polar entre K353 y el carbonilo de Y495 (que cambia su estereoquímica de trans a cis por influencia de la mutación N501Y) (24). Es en este momento, dada la mutación, que se muestra un bolsillo que permite un mejor anclaje que estabiliza la interacción π - π entre los residuos Y501 de la proteína spike y Y41 del receptor hACE2 (promedio RMSF=0.572Å para las variantes wild type, alpha, gamma y omicron BA.1) (figura 5).

En la variante delta, las dos únicas mutaciones en el RBD fueron L452R y T478K—en ambos casos por residuos cargados— las cuales se encargan de reorganizar y estabilizar la estructura a lo largo de la simulación (figura 7a). En el caso de R452 al interactuar con E35 y repelerse con K31 para así reforzar la unión de N501 con Y41 y de K353 con Q498 (sitio caliente de interacción), y de K478 con E75 y Q24, estableciendo una relación de atracción/repulsión para contribuir a la red electrostática que domina la interacción entre el RBM de la proteína spike y hACE2 (figura 7b).

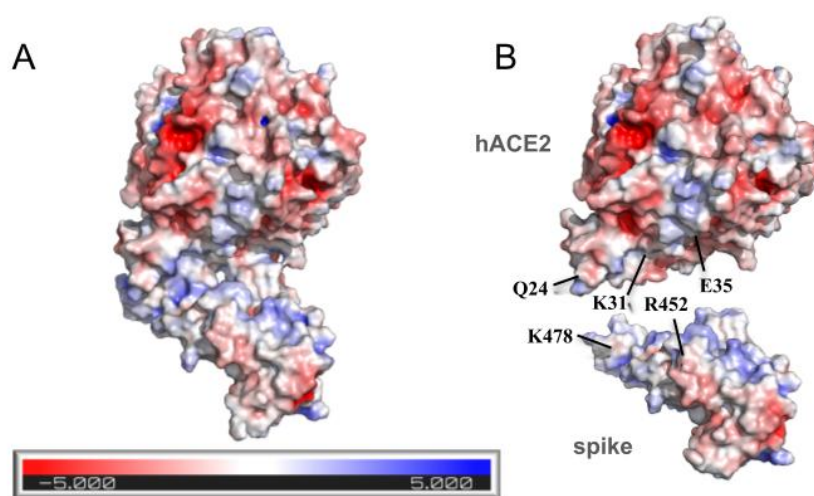


Figura 7: (A) Superficie electrostática APBS calculada con PyMOL de la proteína spike de SARS-CoV-2 en complejo con hACE2 en la variante delta (PDB ID 7wbq). (B) En la figura se puede observar la redistribución de cargas que resulta en la repulsión entre K478 con Q24, la repulsión entre la superficie de R452 con K31 y la atracción entre R452 con E35.

En la variante omicron, es importante mencionar que la red de enlaces en dos regiones importantes se ven afectadas por las mutaciones: las mutaciones S371L, S373P y S375F (todas por residuos hidrofóbicos) influyen sobre la conformación del RBD y funcionalmente reducen la unión a anticuerpos, y por otra parte la mutación Y505H afecta a la región de anclaje afectando la interacción polar con el residuo K353 del receptor hACE2 (7, 8). Estas fluctuaciones se pueden observar en el gráfico de RMSF, pero al cambiar la red de contactos no ganan flexibilidad lo cual no influye en gran medida sobre las fluctuaciones de la cadena principal (figura 5). Además, pero no menos importantes, las mutaciones G446S y G339D presentan fluctuaciones de 1.5Å sobre la conformación

del *core* del RBD dado que influyen sobre la red de interacciones del RBM y probablemente sobre la interacción con anticuerpos neutralizantes.

En el receptor hACE2, se observan tres picos de fluctuaciones por encima de 3Å hasta 6Å: E60 (solo en la variante wild type), L136 y D338 (Figura 8). El residuo E60 está localizado en el dominio peptidasa y no interactúa directamente con la proteína spike, L136 al ser un residuo hidrofóbico se encuentra en dirección al interior del receptor siendo importante para la estabilidad del núcleo y, finalmente, el residuo D338 si bien se encuentra en un sitio caliente con la proteína spike presenta un bajo porcentaje de interacción polar cuando hay mutaciones como K417T, L452R, T478K, Q493R. Siendo estas tres más relevantes para la estructura y no para la interacción. Tal como se mencionó anteriormente, los residuos de mayor importancia en la interacción (o anclaje), con fluctuaciones que se aproximan a 1Å —debido a que forman contactos estables— son: K31, E35, D38, Y41 y K353.

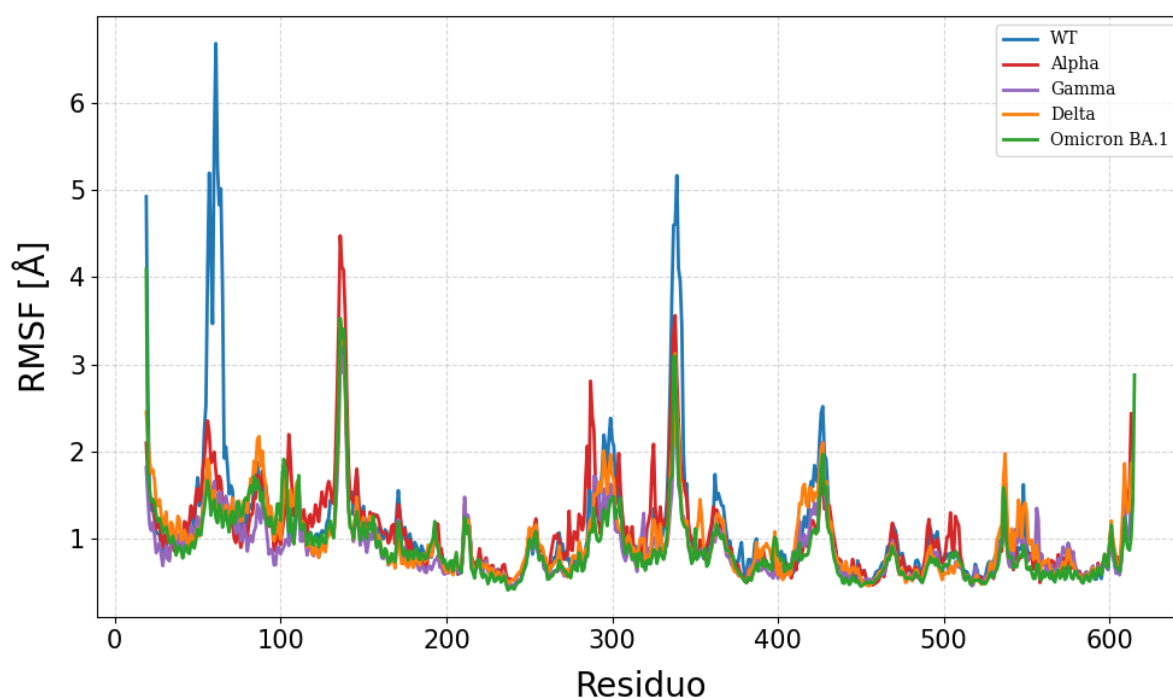


Figura 8: Comparación de fluctuaciones RMSF de la proteína hACE2 de los complejos de las variantes de SARS-CoV-2. En el gráfico se muestran picos prominentes en el residuo E60 (5.589Å) correspondiente al dominio peptidasa solo en la variante wild type, L136 (núcleo de la proteína spike) y D338 (con orientación hacia la región de interacción con el receptor).

El promedio de puentes de hidrógeno también fue calculado con la caja de herramientas de GROMACS. Para ello se utilizó un índice que separó ambas moléculas y calculó el

promedio de puentes de hidrógeno con un *cut-off* de 3.50Å en función del tiempo en ns (figura 9). Con este análisis se pudieron obtener los valores promedios y los máximos en función del tiempo para los 10001 frames obtenidos a lo largo de la simulación de MD. El complejo wild type (máximo=16, promedio=9.00) mostró un comportamiento similar al complejo alpha (máximo=17, promedio=8.71), que contiene una única mutación N501Y, y omicron BA.1 (máximo=17, promedio=9.81), que contiene las mutaciones compensatorias Q493R y Q498R, a diferencia de los demás complejos que fueron en orden decreciente respecto a su aparición a lo largo de la pandemia de COVID-19: gamma (máximo=15, promedio=7.70), que pierde un puente salino estable (presente en las variantes wild type, alpha y delta) entre K417 y D30, y delta (máximo=13, promedio=6.22) que reordena y causa una atracción/repulsión electrostática —visible a lo largo de la simulación— sobre la región central de la interfaz y modifica las interacciones en región de anclaje, debido a las mutaciones L452R y T478K (figura 7b).

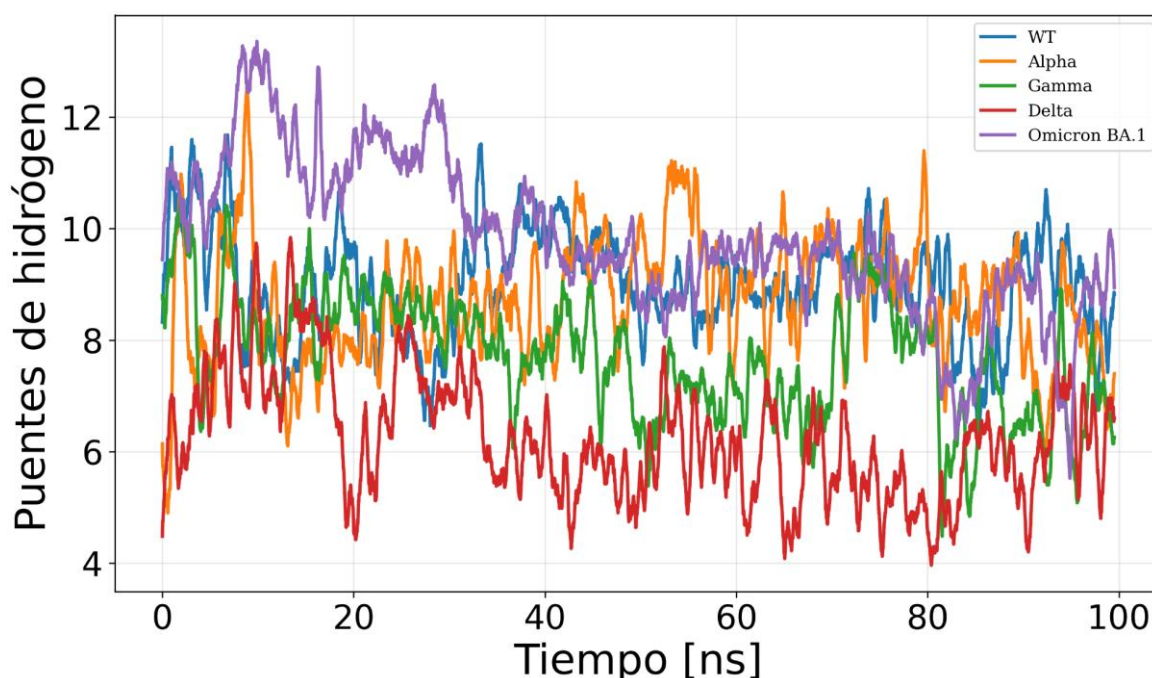


Figura 9: Gráfico de puentes de hidrógeno vs. tiempo en la interfaz de interacción entre el RBD de la proteína spike y el receptor hACE2 de los complejos de las variantes de SARS-CoV-2.

Las diferencias entre la variante wild type y la variante alpha se dan únicamente por la mutación N501Y, la cual cambia la orientación de la cadena lateral para formar una

interacción π - π en resonancia con el residuo Y41 del receptor hACE2 (figura 6c). Es por ello, que la mayoría de contactos polares a lo largo de la interacción se mantienen constantes.

En la variante omicron BA.1, se pierden gran parte de los contactos que se dan en las variantes wild type y alpha, pero se introducen nuevos debido a puentes de hidrógeno y puentes salinos generados por las mutaciones Q493R, Q498R y N501Y; compensando el número total de interacciones (figura 6d). Esta reorganización le otorga una mayor afinidad de unión y estabilidad estructural pese a la gran cantidad de mutaciones. Siendo un claro ejemplo de canalización estructural inducida por mutaciones en la evolución del virus.

Ello no se ve en las variantes gamma y delta, debido a que las mutaciones alteran la geometría y desplazan los componentes donadores y aceptores. En la variante gamma se observa la pérdida del puente salino en K417T (muta por un residuo no cargado de cadena corta) y en la variante delta por las mutaciones L452R y T478K, las cuales causan un fenómeno de atracción/repulsión de cargas en la interacción (figura 7b). De esta manera, la pérdida de contactos relevantes y los cambios electrostáticos le otorga mayor flexibilidad a la interfaz.

El volumen o radio de giro (en términos físicos) también fue calculado obteniendo un promedio de 30.20Å para todas las variantes de estudio (gráfico no se muestra), siendo irrelevante para el análisis. No obstante, ello demuestra que la compensación en la interacción permite que no hayan grandes cambios en la conformación del complejo. De la misma manera, el área de accesibilidad al solvente no mostró resultados relevantes sin tener diferencias significativas a lo largo de las cinco simulaciones.

4.2. Análisis de componentes principales

El fenómeno de epistasis intramolecular corresponde a la interacción entre dos mutaciones que ocurren en residuos no contiguos en una misma proteína y se compensan para mantener la función. En un artículo —publicado bajo revisión por pares— que antecede a la presente tesis, se postuló que este fenómeno era factible en la variante gamma al tomar como referencia la energía libre obtenida en función del movimiento de la cadena principal del RBD en interacción con el receptor hACE2 (24). Sin embargo, este artículo no tomaba en cuenta el movimiento esencial y la relación entre el

movimiento continuo de las regiones del RBD que podrían estar en epistasis. Asimismo, el análisis termodinámico previo solo identificó a la variante gamma en epistasis y en este proyecto se estudiaron cinco variantes para generalizar este patrón evolutivo sobre la canalización estructural de la proteína.

Para inferir sobre este fenómeno se utilizó el análisis de componentes principales (PCA), con la finalidad de estudiar los modos (componentes) en cada una de las variantes de estudio. Con las cinco variantes de estudio se construyó una matriz de covarianza sobre la cual se realizó el PCA y se obtuvieron los valores propios y vectores propios para los primeros diez componentes principales (figura 10).

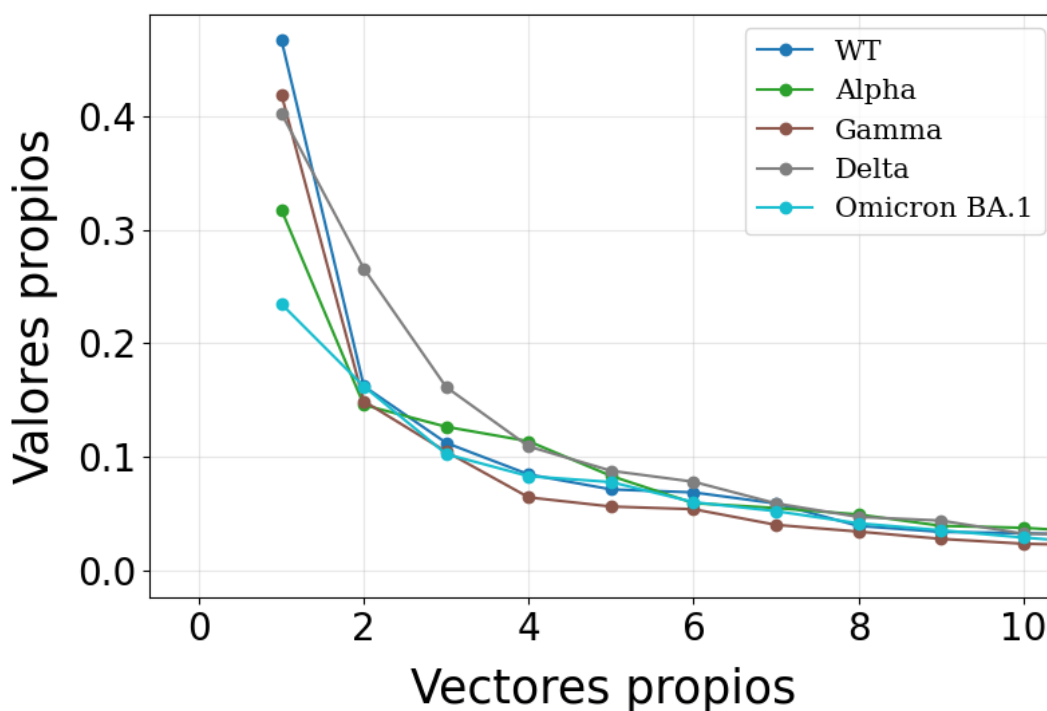


Figura 10: Comparación de valores propios para los primeros diez componentes principales de los complejos de las variantes de SARS-CoV-2.

Esto significa que los primeros componentes concentran la mayor parte de la varianza de los datos y por lo tanto de los modos de movimiento de la proteína. Entre las cinco simulaciones de MD se ven ligeras diferencias en magnitud. La wild type empieza con un valor propio más alto que los demás seguido de las variantes gamma, delta y luego están las variantes alpha y omicron BA.1.

Con respecto a la distribución de la varianza, el descenso de los valores propios implica que pocas dimensiones son suficientes para capturar la mayor información del movimiento esencial. Para explicar la varianza se calculó la varianza explicada y la varianza acumulada para las cinco variantes (tabla 2).

Tabla 2: Cálculos de varianza explicada y acumulada para las cinco VoC's en los tres primeros componentes principales (PC). *Todos los cálculos fueron hechos en la terminal de Ubuntu mediante un programa de autoría propia publicado en GitHub (Verse en la sección VIII de datos disponibles).

Variante	PC1		PC2		PC3	
	Var Exp (%)	Var Acu (%)	Var Exp (%)	Var Acu (%)	Var Exp (%)	Var Acu (%)
Wild type	34.58	34.58	12.03	46.61	8.33	54.94
Alpha	25.43	25.43	11.69	37.12	10.15	47.27
Gamma	36.45	36.45	12.99	49.44	9.12	58.56
Delta	26.36	26.36	17.42	43.79	10.59	54.38
Omicron BA.1	22.07	22.07	15.26	37.32	9.66	46.99

La varianza explicada indica que la mayor proporción de la varianza se captura del primer componente principal, el cual explica la mayor variabilidad de las trayectorias atómicas. La variante gamma es la que concentra mayor varianza en el primer componente principal, incluso más que la wild type. Esto significa que su variabilidad está muy marcada en una sola dirección. La variante wild type también concentra bastante varianza en el primer componente, pero en el acumulado de los tres primeros componentes es menor que la variante gamma (54.94% vs. 58.56%). En la variante alpha, la varianza está mucho más dispersa en el primer componente y junto con la variante omicron BA.1 acumulan el menor porcentaje de varianza en los tres primeros componentes principales. La variante delta acumula poca varianza en el primer componente —igual que en la variante alpha— pero un segundo componente relativamente fuerte, lo que resulta en un acumulado de 54.38% en los tres primeros componentes. Finalmente, la variante omicron BA.1 —la de mayor complejidad estructural— es la más dispersa de las cinco, con apenas 22.07% en el primer componente y 46.99% acumulado en los tres primeros componentes.

En resumen, las variantes gamma y wild type son las más compactas con gran parte de la varianza capturada en los tres primeros componentes principales, la variante delta reparte mayor varianza entre el primer y segundo componente principal —aún logrando un acumulado similar a la variante wild type— y alpha y omicron BA.1 son las más dispersas y requieren más componentes principales para alcanzar niveles altos de explicación, es decir cómo se relaciona el movimiento con la función de la molécula.

V. DISCUSIÓN

El análisis de las mutaciones de dinámica molecular de las variantes de SARS-CoV-2 revelan un patrón caracterizado por la canalización estructural inducida: dado que las mutaciones no actúan de manera aislada, sino que reorganizan la red de interacciones y movimientos colectivos para mantener la estructura del complejo y por ende la función frente a pérdidas locales de estabilidad compensadas por epistasis intramolecular (32-33).

Los valores de RMSD en las cinco variantes de estudio indican una estabilidad estructural sostenida a lo largo de la simulación. Sin embargo, a nivel local con el RMSF se muestran diferencias en algunas regiones relevantes. En la variante delta el *loop* S371-F375 se muestra altamente flexible —dejándolo expuesto al reconocimiento por anticuerpos— y la región N501-Y505 muestra picos de aproximadamente 2Å, lo cual refleja cierta influencia de las mutaciones a la región de anclaje, dado que estas fluctuaciones permiten la formación de nuevas interacciones polares. En la variante gamma, el residuo N385 también muestra un pico que podría estar relacionado con la inmunogenicidad. De esta manera, estos resultados sugieren que, si bien la estructura global se mantiene estable, las mutaciones modulan la dinámica local.

Asimismo, respecto a las interacciones polares, la variante wild type y la variante alpha mantienen un promedio cercano a nueve puentes de hidrógeno a lo largo de la simulación en la región de anclaje rondando el residuo 501 y el puente salino en K417. En la variante alpha, al igual que en gamma y omicron BA.1, la mutación N501Y elimina contactos con K353 y Q498, pero introduce una interacción con Y41 entrando en una resonancia entre los dos anillos para estabilizar la región de anclaje (34). En la variante gamma, se pierde el puente salino con D30 debido a la mutación K417T lo cual reduce el promedio a 7.7, lo cual explica una menor estabilidad y una mayor flexibilidad observada pese a que la mutación E484K introduce nuevos puentes de hidrógeno con E35 y E75 (35). Sin embargo, estos tienen un bajo porcentaje de ocurrencia y no son constantes a lo largo de la simulación; lo relevante es la relación electrostática entre ambos frentes. En la variante delta, las mutaciones L452R y T478K introducen cargas repulsivas que disminuyen el promedio de puentes de hidrógeno a 6.22 lo cual le otorga una mayor flexibilidad a la interfaz. Con la variante omicron BA.1, se reorganiza la red de contactos mediante la aparición de nuevas interacciones generadas por las mutaciones Q493R, Q498R y N501Y, alcanzando el mayor promedio de puentes de hidrógeno de 9.81. No obstante, se

pierden contactos los cuales se ven compensados formando puentes salinos alternativos con un alto porcentaje de ocurrencia con E35, D38 y K353 en el receptor hACE2, reforzando la afinidad. Este patrón de mutaciones revela que las variantes con menor promedio de contactos polares sacrifican la estabilidad por la flexibilidad — probablemente como recambio antigénico—, mientras que omicron BA.1 compensa mediante una reconfiguración de la red de interacciones (36-38).

El PCA complementa lo observado en las simulaciones de MD al mostrar cómo las mutaciones influyen sobre la distribución de la varianza. En el complejo wild type y gamma, se concentra gran parte de la varianza en el primer componente principal (>34%), lo cual indica movimientos dominantes. En la variante delta, la varianza se reparte entre el primer y segundo componente principal, lo cual refleja la presencia de dos modos de movimiento relevantes a lo largo de la simulación. En las variantes alpha y omicron BA.1 (de mayor complejidad estructural debido a las mutaciones), se observa una gran dispersión de la varianza con menos del 25% en el primer componente principal y una distribución acumulada baja entre los tres primeros componentes principales. Ello es indicativo de que se requiere de múltiples modos de movimiento para describir la dinámica molecular.

Correlacionando los resultados del análisis estructural con el PCA es claro que: las variantes con menos contactos polares (gamma y delta) muestran movimientos más definidos, mientras que omicron BA.1, pese a la dispersión de la varianza en los tres primeros componentes principales, logra reorganizar la dinámica para mantener la estructura y función del complejo. En la variante alpha, la presencia de una única mutación N501Y en el RBD reorganiza la red de contactos al perder por completo el puente de hidrógeno entre K353 y Q498 con Y501. Esta reorganización de interacciones polares repercute sobre la estructura de la interfaz y conlleva a que se genere más de un modo de movimiento, lo cual se observa en la distribución equitativa de la varianza entre los tres primeros componentes principales.

En conjunto, los resultados ilustran —a través de simulaciones computacionales— un proceso de reorganización adaptativa canalizando a la estructura hacia configuraciones funcionales alternativas (variantes). La evolución del SARS-CoV-2 no se rige por un patrón de pérdida y ganancia de estabilidad, sino por un patrón de compensación y mantenimiento de la estabilidad y afinidad de unión. Tal como se observa en los

resultados, hay mutaciones como K417T en la variante gamma —que es K417N en omicron BA.1—, L452R/T478K en delta que reducen ligeramente la estabilidad del complejo, pero se compensan por cambios en la geometría espacial que conduce a rearrreglos en la red de contactos polares (39-41). Asimismo, en la variante omicron BA.1 —que también se observa en la variante gamma entre las mutaciones K417T, E484K y N501Y— hay una compensación entre mutaciones como N501Y, Q493R y Q498R (compensación electrostática) que restauran e incluso mejoran ligeramente la afinidad de unión (24, 42-44). En el caso particular de la variante alpha, la cual contiene una única mutación N501Y, no solo cambia un contacto polar por una interacción hidrofóbica con Y41 en el receptor hACE2, sino que se redistribuye la dinámica del complejo (45). Ello demuestra que la evolución del virus se basa en un equilibrio entre la pérdida y ganancia de interacciones, que se mantiene constante donde incluso una sola mutación puede desencadenar un mecanismo de compensación y epistasis intramolecular para preservar la función.

VI. CONCLUSIONES

Con el fin de la pandemia, el virus se tornó endémico pero dejó muchas enseñanzas a nivel de la investigación científica, economía y políticas de salud pública. En el presente trabajo se profundizó en la dinámica esencial de cinco variantes de SARS-CoV-2: wild type, alpha, gamma, delta y omicron BA.1.

De las simulaciones de dinámica molecular se muestra que, en todas las variantes, la estructura del RBD de la proteína spike se mantiene estable con valores de RMSD que no representan diferencias significativas. Del análisis de interacciones polares, se observó que en las variantes wild type, alpha y omicron BA.1, se conservan o reorganizan los contactos, mientras que en las variantes gamma y delta se pierden interacciones clave reduciendo la estabilidad y aumentando la flexibilidad estructural de la interfaz de interacción.

Del análisis de componentes principales, se muestra que las variantes wild type y gamma la varianza se concentra en un único modo de movimiento dominante (varianza explicada alta en el primer componente principal), la variante delta lo reparte en dos y las variantes alpha y omicron BA.1 presentan una dinámica esencial dispersa en los tres primeros componentes principales, reflejando una mayor complejidad estructural.

Asimismo, es importante concluir que la mutación N501Y en alpha, gamma y omicron BA.1 reorganiza la interfaz de interacción, sustituyendo una interacción polar por una hidrofóbica π - π con el residuo Y41 en hACE2, incrementando la fuerza en la región de anclaje. En particular en omicron BA.1, Q493R y Q498R generan nuevos puentes salinos que compensan y refuerzan la pérdida del contacto entre K353 y Q498 con Y501. De esta manera, la reorganización de la red de interacción mantiene la afinidad de unión y la función.

Sobre la canalización estructural, observamos que los resultados **sugieren** que existe una inducción por parte de las mutaciones a generar nuevos fenotipos estables eliminando contactos importantes para una variante y compensando —mediante epistasis intramolecular— esta pérdida en otras, reorganizando la dinámica de interacciones. Este equilibrio podría explicar la evolución funcional del RBD y el impacto que tiene la dinámica esencial sobre la transmisibilidad y evasión inmunológica, permitiéndole prevalecer en el tiempo.

En conclusión, los resultados obtenidos permitieron comprender cómo las mutaciones en el RBD de la proteína spike reorganizaron la red de interacciones moleculares, manteniendo la afinidad de unión y modulando la dinámica esencial de cada variante. Este comportamiento reflejó un equilibrio adaptativo en el que la pérdida de interacciones críticas fue compensada por nuevas interacciones, lo que explica la persistencia funcional del virus y su capacidad de transmisión y evasión inmunológica. Sin embargo, es importante señalar que no se realizaron análisis energéticos, ya que aún no se dispone de las ecuaciones de acoplamiento energético ni de un programa capaz de calcular dichos parámetros a partir de las simulaciones de dinámica molecular. Por ello, estas conclusiones se basan exclusivamente en la estabilidad estructural, las interacciones polares y la dinámica esencial derivada del PCA, dejando abierta la necesidad de futuros estudios que integren el cálculo de parámetros energéticos para una caracterización más completa y rigurosa de los fenómenos de compensación (epistasis intramolecular) y canalización estructural inducida.

VII. COMENTARIOS FINALES

A partir de las simulaciones computacionales realizadas, se sugiere la presencia de un posible mecanismo de canalización estructural y epistasis intramolecular, mediante los cuales ciertas mutaciones podrían compensarse entre sí para favorecer la estabilidad de la interacción con el receptor hACE2.

Para confirmar ello, es necesario complementar este trabajo con un estricto análisis físico/matemático/computacional del acoplamiento energético entre regiones de la misma estructura molecular, y, posteriormente, con estudios genéticos, que incluyan mutagénesis dirigida, con la finalidad de dar validez biológica a las simulaciones de dinámica molecular.

En el estudio, la reproducibilidad y la robustez de los datos no depende estrechamente de la cantidad de réplicas en dinámica molecular, porque lo fundamental fue la calidad del muestreo y la validez estadística del protocolo. El hecho de añadir más réplicas no garantiza mayor fidelidad si el sistema no había sido equilibrado correctamente, si el campo de fuerzas había sido inadecuado o si el tiempo de simulación había resultado insuficiente para explorar el espacio conformacional. La reproducibilidad se aseguró mediante la consistencia en las condiciones iniciales (modelos estructurales iniciales) y la convergencia de las trayectorias hacia distribuciones estables, mientras que la robustez se sostuvo en la insensibilidad de los resultados frente a variaciones menores en parámetros. En consecuencia, tanto la reproducibilidad como la robustez se vincularon más con la calidad del diseño metodológico que con el número de réplicas ejecutadas.

Finalmente, traigo a colación la misma pregunta que propuse en la tesis de la maestría de inmunología titulada “Análisis de Dinámica Molecular y Energía Libre de Interacción de la Variante Gamma en Interacción con hACE2”, publicada en el repositorio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, ¿Estamos ante un nuevo mecanismo de evolución? En respuesta a ello, estos hallazgos vislumbran avances notables en la elucidación del mecanismo evolutivo.

VIII. DATA DISPONIBLE

Las simulaciones de dinámica molecular se encuentran de acceso libre con el siguiente link:

https://drive.google.com/drive/folders/1mo0tKSLZt5DjSFQC7XpWGxXolyB0GpMv?usp=drive_link.

Asimismo, los programas con los que se realizaron los gráficos y el análisis de las simulaciones se pueden visualizar en el siguiente link: [Mzcavanib \(Maurizio Cavani\) · GitHub](#).

IX. LIMITACIONES

La tesis identifica patrones de reorganización estructural compatibles con fenómenos de compensación dinámica y epistasis intramolecular durante la evolución viral, ofreciendo una interpretación coherente con dichos procesos. Sin embargo, esta evidencia no se presenta de manera directa, ya que no se realizaron cálculos energéticos en el desarrollo del trabajo. Cabe señalar que en el artículo previo a esta tesis sí se efectuaron los cálculos energéticos correspondientes para la variante Gamma, lo que permitió vislumbrar el fenómeno de epistasis intramolecular (24).

Los resultados expuestos en la presente investigación provienen de simulaciones prolongadas de dinámica molecular, replicadas por triplicado para garantizar mayor rigor científico. El objetivo principal de las réplicas fue optimizar los parámetros de minimización de energía y los pasos de equilibrio. No obstante, es importante destacar que, a diferencia de los experimentos realizados en laboratorio húmedo (“wet lab”), en este caso no era estrictamente necesario realizar réplicas adicionales, dado que las simulaciones mostraron estabilidad desde el inicio.

X. FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue autofinanciado en su totalidad, utilizando los activos del Laboratorio de Moléculas Individuales de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, Geng Q, Auerbach A, Li F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*. 2020 May 14;581(7807):221-4.
- (2) Zhang J, Xiao T, Cai Y, Chen B. Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Current opinion in virology*. 2021 Oct 1;50:173-82.
- (3) Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2022 Jan;23(1):3-20.
- (4) Yao H, Song Y, Chen Y, Wu N, Xu J, Sun C, Zhang J, Weng T, Zhang Z, Wu Z, Cheng L. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell*. 2020 Oct 29;183(3):730-8.
- (5) Miyah Y, Benjelloun M, Lairini S, Lahrichi A. COVID-19 impact on public health, environment, human psychology, global Socioeconomy, and education. *The Scientific World Journal*. 2022;2022(1):5578284.
- (6) Etodike CE, Ekeghalu EC, Ani KJ, Mutambara E. Covid-19 Fatality Rate in Third World Countries: A Review of Environmental Challenges and Impacts on Public Health and Human Security. *Journal of Intellectual Disability-Diagnosis and Treatment*. 2021;9(1):39-44.
- (7) McCallum M, Czudnochowski N, Rosen LE, Zepeda SK, Bowen JE, Walls AC, Hauser K, Joshi A, Stewart C, Dillen JR, Powell AE. Structural basis of SARS-CoV-2 Omicron immune evasion and receptor engagement. *Science*. 2022 Feb 25;375(6583):864-8.
- (8) Zhang J, Xiao T, Cai Y, Lavine CL, Peng H, Zhu H, Anand K, Tong P, Gautam A, Mayer ML, Walsh Jr RM. Membrane fusion and immune evasion by the spike protein of SARS-CoV-2 Delta variant. *Science*. 2021 Dec 10;374(6573):1353-60.
- (9) Sun C, Xie C, Bu GL, Zhong LY, Zeng MS. Molecular characteristics, immune evasion, and impact of SARS-CoV-2 variants. *Signal transduction and targeted therapy*. 2022 Jun 28;7(1):202.

- (10) Mannar D, Saville JW, Poloni C, Zhu X, Bezeruk A, Tidey K, Ahmed S, Tuttle KS, Vahdatihassani F, Cholak S, Cook L. Altered receptor binding, antibody evasion and retention of T cell recognition by the SARS-CoV-2 XBB. 1.5 spike protein. *Nature Communications*. 2024 Feb 29;15(1):1854.
- (11) Zhang X, Lam SJ, Ip JD, Fong CH, Chu AW, Chan WM, Lai YS, Tsoi HW, Chan BP, Chen LL, Meng X. Characterizing fitness and immune escape of SARS-CoV-2 EG. 5 sublineage using elderly serum and nasal organoid. *Iscience*. 2024 May 17;27(5).
- (12) Liu Y, Zhao X, Shi J, Wang Y, Liu H, Hu YF, Hu B, Shuai H, Yuen TT, Chai Y, Liu F. Lineage-specific pathogenicity, immune evasion, and virological features of SARS-CoV-2 BA. 2.86/JN. 1 and EG. 5.1/HK. 3. *Nature communications*. 2024 Oct 9;15(1):8728.
- (13) Liu Y, Liu J, Plante KS, Plante JA, Xie X, Zhang X, Ku Z, An Z, Scharton D, Schindewolf C, Widen SG. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. *Nature*. 2022 Feb 10;602(7896):294-9.
- (14) Jangra S, Ye C, Rathnasinghe R, Stadlbauer D, Alshammary H, Amoako AA, Awawda MH, Beach KF, Bermúdez-González MC, Chernet RL, Eaker LQ. SARS-CoV-2 spike E484K mutation reduces antibody neutralisation. *The Lancet Microbe*. 2021 Jul 1;2(7):e283-4.
- (15) Zhang F, Schmidt F, Muecksch F, Wang Z, Gazumyan A, Nussenzweig MC, Gaebler C, Caskey M, Hatzioannou T, Bieniasz PD. SARS-CoV-2 spike glycosylation affects function and neutralization sensitivity. *Mbio*. 2024 Feb 14;15(2):e01672-23.
- (16) Bartoli A, Gabrielli F, Alicandro T, Nascimbeni F, Andreone P. COVID-19 treatment options: a difficult journey between failed attempts and experimental drugs. *Internal and emergency medicine*. 2021 Mar;16(2):281-308.
- (17) Ssentongo P, Ssentongo AE, Voleti N, Groff D, Sun A, Ba DM, Nunez J, Parent LJ, Chinchilli VM, Paules CI. SARS-CoV-2 vaccine effectiveness against infection, symptomatic and severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *BMC infectious diseases*. 2022 May 7;22(1):439.

- (18) Huiberts AJ, Hoeve CE, de Gier B, Cremer J, van der Veer B, de Melker HE, van de Wijgert JH, van den Hof S, Eggink D, Knol MJ. Effectiveness of Omicron XBB. 1.5 vaccine against infection with SARS-CoV-2 Omicron XBB and JN. 1 variants, prospective cohort study, the Netherlands, October 2023 to January 2024. *Eurosurveillance*. 2024 Mar 7;29(10):2400109.
- (19) Feldstein LR, Britton A, Grant L, Wiegand R, Ruffin J, Babu TM, Hagen MB, Burgess JL, Caban-Martinez AJ, Chu HY, Ellingson KD. Effectiveness of bivalent mRNA COVID-19 vaccines in preventing SARS-CoV-2 infection in children and adolescents aged 5 to 17 years. *Jama*. 2024 Feb 6;331(5):408-16.
- (20) Torner N. El fin de la emergencia internacional de salud pública por el COVID-19:¿ y ahora qué?. *Vacunas*. 2023 May 18.
- (21) Moulana A, Dupic T, Phillips AM, Chang J, Nieves S, Roffler AA, Greaney AJ, Starr TN, Bloom JD, Desai MM. Compensatory epistasis maintains ACE2 affinity in SARS-CoV-2 Omicron BA. 1. *Nature communications*. 2022 Nov 16;13(1):7011.
- (22) Rochman ND, Faure G, Wolf YI, Freddolino L, Zhang F, Koonin EV. Epistasis at the SARS-CoV-2 receptor-binding domain interface and the propitiously boring implications for vaccine escape. *MBio*. 2022 Apr 26;13(2):e00135-22.
- (23) Rodriguez-Rivas J, Croce G, Muscat M, Weigt M. Epistatic models predict mutable sites in SARS-CoV-2 proteins and epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022 Jan 25;119(4):e2113118119.
- (24) Cavani M, Riofrío WA, Arciniega M. Molecular dynamics and MM-PBSA analysis of the SARS-CoV-2 gamma variant in complex with the hACE-2 receptor. *Molecules*. 2022 Apr 6;27(7):2370.
- (25) Nesteruk I. Endemic characteristics of SARS-CoV-2 infection. *Scientific Reports*. 2023 Sep 8;13(1):14841.
- (26) Sinha A, Sangeet S, Roy S. Evolution of sequence and structure of SARS-CoV-2 spike protein: a dynamic perspective. *ACS omega*. 2023 Jun 21;8(26):23283-304.

- (27) Waddington CH. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*. 1942 Nov 14;150(3811):563-5.
- (28) Moradi S, Nowroozi A, Nezhad MA, Jalali P, Khosravi R, Shahlaei M. A review on description dynamics and conformational changes of proteins using combination of principal component analysis and molecular dynamics simulation. *Computers in Biology and Medicine*. 2024 Dec 1;183:109245.
- (29) Palma J, Pierdominici-Sottile G. On the uses of PCA to characterise molecular dynamics simulations of biological macromolecules: basics and tips for an effective use. *ChemPhysChem*. 2023 Jan 17;24(2):e202200491.
- (30) DeLano WL. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl. protein crystallogr*. 2002 Mar;40(1):82-92.
- (31) Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*. 2005 Dec;26(16):1701-18.
- (32) Verkhivker G, Alshahrani M, Gupta G. Balancing functional tradeoffs between protein stability and ACE2 binding in the SARS-CoV-2 omicron BA. 2, BA. 2.75 and XBB lineages: dynamics-based network models reveal epistatic effects modulating compensatory dynamic and energetic changes. *Viruses*. 2023 May 10;15(5):1143.
- (33) Verkhivker GM, Di Paola L. Dynamic network modeling of allosteric interactions and communication pathways in the SARS-CoV-2 spike trimer mutants: Differential modulation of conformational landscapes and signal transmission via cascades of regulatory switches. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2021 Jan 15;125(3):850-73.
- (34) Li Z, Zhang JZ. Mutational effect of some major COVID-19 variants on binding of the S protein to ACE2. *Biomolecules*. 2022 Apr 13;12(4):572.
- (35) Nelson G, Buzko O, Spilman P, Niazi K, Rabizadeh S, Soon-Shiong P. Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y. V2 variant)

induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant. *BioRxiv*. 2021 Jan 13:2021-01.

- (36) Pitsillou E, Liang JJ, Beh RC, Hung A, Karagiannis TC. Molecular dynamics simulations highlight the altered binding landscape at the spike-ACE2 interface between the Delta and Omicron variants compared to the SARS-CoV-2 original strain. *Computers in Biology and Medicine*. 2022 Oct 1;149:106035.
- (37) Kodchakorn K, Kongtawelert P. Molecular dynamics study on the strengthening behavior of Delta and Omicron SARS-CoV-2 spike RBD improved receptor-binding affinity. *PloS one*. 2022 Nov 17;17(11):e0277745.
- (38) Khan A, Khan SA, Zia K, Altowyan MS, Barakat A, Ul-Haq Z. Deciphering the impact of mutations on the binding efficacy of SARS-CoV-2 omicron and delta variants with human ACE2 receptor. *Frontiers in Chemistry*. 2022 Jun 8;10:892093.
- (39) Barros EP, Casalino L, Gaieb Z, Dommer AC, Wang Y, Fallon L, Raguet L, Belfon K, Simmerling C, Amaro RE. The flexibility of ACE2 in the context of SARS-CoV-2 infection. *Biophysical journal*. 2021 Mar 16;120(6):1072-84.
- (40) Polydorides S, Archontis G. Computational optimization of the SARS-CoV-2 receptor-binding-motif affinity for human ACE2. *Biophysical Journal*. 2021 Jul 20;120(14):2859-71.
- (41) Moreira RA, Guzman HV, Boopathi S, Baker JL, Poma AB. Characterization of structural and energetic differences between conformations of the SARS-CoV-2 spike protein. *Materials*. 2020 Nov 26;13(23):5362.
- (42) Philip AM, Ahmed WS, Biswas KH. Reversal of the unique Q493R mutation increases the affinity of Omicron S1-RBD for ACE2. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2023 Jan 1;21:1966-77.
- (43) Barroso da Silva FL, Giron CC, Laaksonen A. Electrostatic features for the receptor binding domain of SARS-COV-2 wildtype and its variants. Compass to the severity of the future variants with the charge-rule. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2022 Sep 6;126(36):6835-52.

- (44) Mahase V, Sobitan A, Yao Q, Shi X, Qin H, Kidane D, Tang Q, Teng S. Impact of missense mutations on spike protein stability and binding affinity in the omicron variant. *Viruses*. 2024 Jul 17;16(7):1150.
- (45) Xia S, Wen Z, Wang L, Lan Q, Jiao F, Tai L, Wang Q, Sun F, Jiang S, Lu L, Zhu Y. Structure-based evidence for the enhanced transmissibility of the dominant SARS-CoV-2 B. 1.1. 7 variant (Alpha). *Cell discovery*. 2021 Nov 9;7(1):109.