

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Medicina Humana
Escuela Profesional de Medicina Humana



**Efecto del pH sobre la afinidad de unión del complejo semaglutida-GLP-
1R: estudio in silico de la plausibilidad de señalización endosomal y su
relación con la tolerancia clínica - CBCRG UCSM**

Tesis presentada por el Bachiller:

Vasquez Laime, Renato Junior

ORCID: 0009-0007-1494-4685

para optar el Título Profesional de Médico Cirujano

Asesor (a):

Dra. Muñoz Del Carpio Toia, Agueda Rossangella

ORCID: 0000-0003-0501-7314

Arequipa - Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

MEDICINA HUMANA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arcquipa, 19 de Marzo del 2026

Dictamen: 018287-C-EPMH-2026

Visto el borrador del expediente 018287, presentado por:

2013248691 - VASQUEZ LAIME RENATO JUNIOR

Titulado:

**EFECTO DEL PH SOBRE LA AFINIDAD DE UNIÓN DEL COMPLEJO SEMAGLUTIDA-GLP-1R:
ESTUDIO IN SILICO DE LA PLAUSIBILIDAD DE SEÑALIZACIÓN ENDOSOMAL Y SU RELACIÓN
CON LA TOLERANCIA CLÍNICA - CBCRG UCSM**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

MEDICO CIRUJANO

**29481945 - YUCRA SEVILLANO SANDRA
DICTAMINADOR**



**47479747 - SANCHEZ GUILLEN JOHANY CECILIA
DICTAMINADOR**



**29420612 - MANRIQUE SAM MARIA CECILIA
DICTAMINADOR**



EFFECTO DEL PH SOBRE LA AFINIDAD DE UNIÓN DEL COMPLEJO SEMAGLUTIDA-GLP-1R: ESTUDIO IN SILICO DE LA PLAUSIBILIDAD DE SEÑALIZACIÓN ENDOSOMAL Y SU RELACIÓN CON LA TOLERANCIA CLÍNICA - CBCRG UCSM

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	github.com Fuente de Internet	1%
2	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
4	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	accesoabierto.uh.cu Fuente de Internet	<1%
6	repositorio.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	www.frontiersin.org Fuente de Internet	<1%
8	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1%
9	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	<1%
10	www.biorxiv.org Fuente de Internet	<1%
11	diabetespractica.com	

DEDICATORIA

A Víctor y Martín, por su amistad incondicional y por ser el soporte indispensable sin el cual esta tesis no habría sido posible.

A los retos y personas que, a su manera, me enseñaron el incalculable valor de la autonomía y la resiliencia. Gracias por impulsarme a descubrir que el verdadero motor de cualquier logro es la convicción propia y el esfuerzo personal.

A la Chachi, la Pequeta y el Moisés. Escritos en tinta para la posteridad.



AGRADECIMIENTOS

A mi familia, que durante años me vio caer y nunca soltó. Que guardó silencio cuando el silencio era lo más difícil de dar, y que siguió creyendo cuando yo ya no creía en mí. Todo lo que soy empezó en ustedes.

A las personas que dejé a la deriva en este trayecto, y a quienes pusieron el hombro para sostener lo que yo no pude. Durante años elegí ser el arquitecto de mi propio fracaso, sin entender que mi inmadurez también era el desgaste de otros.

A ustedes, que cargaron con mis pendientes y aun así me empujaron a reaccionar: gracias. Esta tesis no es una disculpa, es evidencia. Evidencia de que me levanté. De que entendí el peso de mis actos. Quien hoy defiende este trabajo ya no es quien los defraudó.

A la Dra. Agueda por ser mi faro en medio del caos, gracias por su ayuda invaluable.

A la Dra. Barazorda y al Dr. Chávez Fumagalli, por ver algo en alguien que todavía no lo veía en sí mismo. Por la paciencia que no merecía y la exigencia que necesitaba.

Al Computational Biology and Chemistry Research Group, por darme un lugar donde reconstruirme. Por las herramientas, el rigor y la oportunidad de demostrar que el tiempo perdido no define el final de la historia. Por ser los gigantes que me permitieron ver más allá.

A todos ustedes: gracias por no rendirse conmigo.

EPÍGRAFE

"Si he visto más lejos, es poniéndome sobre los hombros de gigantes."

-Isaac Newton



RESUMEN

Introducción: La semaglutida, agonista del GLP-1R de mayor eficacia para el tratamiento simultáneo de DM2 y obesidad, genera náuseas en el 43.9% de los pacientes (vs. 16.1% placebo, análisis agrupado STEP 1-3). Se propone que su alta afinidad dificulta la disociación del complejo en el endosoma ácido (pH ~5.0), prolongando la señalización en circuitos eméticos.

Objetivo: Evaluar mediante simulaciones de dinámica molecular el efecto de tres condiciones de pH (5.0 endosomal, 7.4 sistémico y 8.0 inducido por SNAC) sobre la estabilidad estructural y la energía libre de unión del complejo semaglutida-GLP-1R en membrana lipídica POPC explícita.

Métodos: Se construyeron nueve sistemas moleculares del complejo semaglutida-GLP-1R en membrana POPC con CHARMM-GUI y se simularon con GROMACS 2025.3/CHARMM36m (3 réplicas \times 3 pH = 1,800 ns totales). Los estados de protonación se asignaron con PropKa 3.0, que identificó siete histidinas del GLP-1R con pKa entre 5.97 y 7.95. La estabilidad conformacional se evaluó mediante RMSD, RMSF y radio de giro; la energía libre de unión se calculó con MM-GBSA (interpretado comparativamente entre condiciones, no como Kd experimental) mediante gmx_MMPBSA v1.6.4. La pose inicial fue validada mediante RMSD backbone vs. PDB 7KIO (0.57-0.82 Å; umbral $<$ 1.5 Å).

Resultados: El ΔG fue de -105.60 ± 33.41 , -131.26 ± 42.70 y -151.35 ± 27.18 kcal·mol⁻¹ para pH 5.0, 7.4 y 8.0, respectivamente. La protonación de siete histidinas a pH 5.0 redujo los puentes de hidrógeno interfaciales de 15.2 ± 5.5 (pH 7.4) a 9.7 ± 3.0 ; el máximo fue a pH 8.0 (18.1 ± 4.4). Se identificaron 22 hotspots farmacológicos ($\Delta G \leq -5.0$ kcal·mol⁻¹), de los cuales 11 presentaron sensibilidad al pH ($|\Delta\Delta G| > 1.0$ kcal·mol⁻¹ entre pH 5.0 y 7.4).

Conclusiones: La afinidad residual comparativamente negativa a pH endosomal (5.0) apoya la plausibilidad computacional de señalización endosomal persistente como sustrato molecular de la intolerancia gastrointestinal. Los hotspots pH-sensibles constituyen dianas para el diseño de análogos con mejor tolerabilidad. Se proponen experimentos de validación mediante mutagénesis dirigida, internalización y degradación lisosomal.

Palabras clave: Semaglutida, GLP-1R, computacional

ABSTRACT

Introduction: Semaglutide, the most efficacious GLP-1R agonist for the combined treatment of type 2 diabetes and obesity, causes nausea in 43.9% of patients (vs. 16.1% placebo, pooled STEP 1-3). Its high receptor affinity may hinder complex dissociation in the acidic endosomal compartment (pH ~5.0), prolonging signaling in emetic circuits.

Objective: To evaluate, using molecular dynamics simulations, the effect of three pH conditions (5.0 endosomal, 7.4 systemic, and 8.0 induced by SNAC) on the structural stability and binding free energy of the semaglutide-GLP-1R complex in an explicit POPC lipid membrane system.

Methods: Nine semaglutide-GLP-1R molecular systems in POPC membrane were constructed with CHARMM-GUI and simulated using GROMACS 2025.3/CHARMM36m (3 replicas \times 3 pH = 1,800 ns total). Protonation states were assigned with PropKa 3.0, which identified seven GLP-1R histidines with pKa values between 5.97 and 7.95. Conformational stability was assessed via RMSD, RMSF, and radius of gyration; binding free energy was calculated using MM-GBSA (interpreted comparatively across conditions, not as experimental Kd equivalents) with gmx_MMPBSA v1.6.4. The initial binding pose was validated by backbone RMSD vs. PDB 7KI0 (0.57-0.82 Å; threshold < 1.5 Å).

Results: ΔG was -105.60 ± 33.41 , -131.26 ± 42.70 , and -151.35 ± 27.18 kcal·mol⁻¹ for pH 5.0, 7.4, and 8.0, respectively. Protonation of seven histidines at pH 5.0 reduced interfacial hydrogen bonds from 15.2 ± 5.5 (pH 7.4) to 9.7 ± 3.0 ; the maximum was recorded at pH 8.0 (18.1 ± 4.4). Twenty-two pharmacological hotspots ($\Delta G \leq -5.0$ kcal·mol⁻¹) were identified, of which 11 showed pH sensitivity ($|\Delta\Delta G| > 1.0$ kcal·mol⁻¹ between pH 5.0 and 7.4).

Conclusions: The comparatively negative residual affinity at endosomal pH (5.0) supports the computational plausibility of persistent endosomal signaling as a molecular substrate of gastrointestinal intolerance. The pH-sensitive hotspots represent candidate targets for the design of analogs with improved tolerability. Validation experiments are proposed, including site-directed mutagenesis, internalization assays, and lysosomal degradation quantification.

Key words: Semaglutide, GLP-1R, computational

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

EPÍGRAFE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN..... 1

CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO TEÓRICO..... 3

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 4

1.1. Determinación del Problema 4

1.2. Enunciado del Problema..... 5

1.3. Descripción del Problema 5

1.4. Justificación del problema..... 8

2. OBJETIVOS 12

2.1. Objetivo General 12

2.2. Objetivos Específicos 12

3. HIPÓTESIS 13

4. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS..... 14

4.1. A Nivel Internacional 14

4.2. A Nivel Nacional y Local..... 15

5. MARCO TEÓRICO 16

CAPÍTULO II MATERIAL Y MÉTODOS 21

1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN 22

1.1. Técnicas..... 22

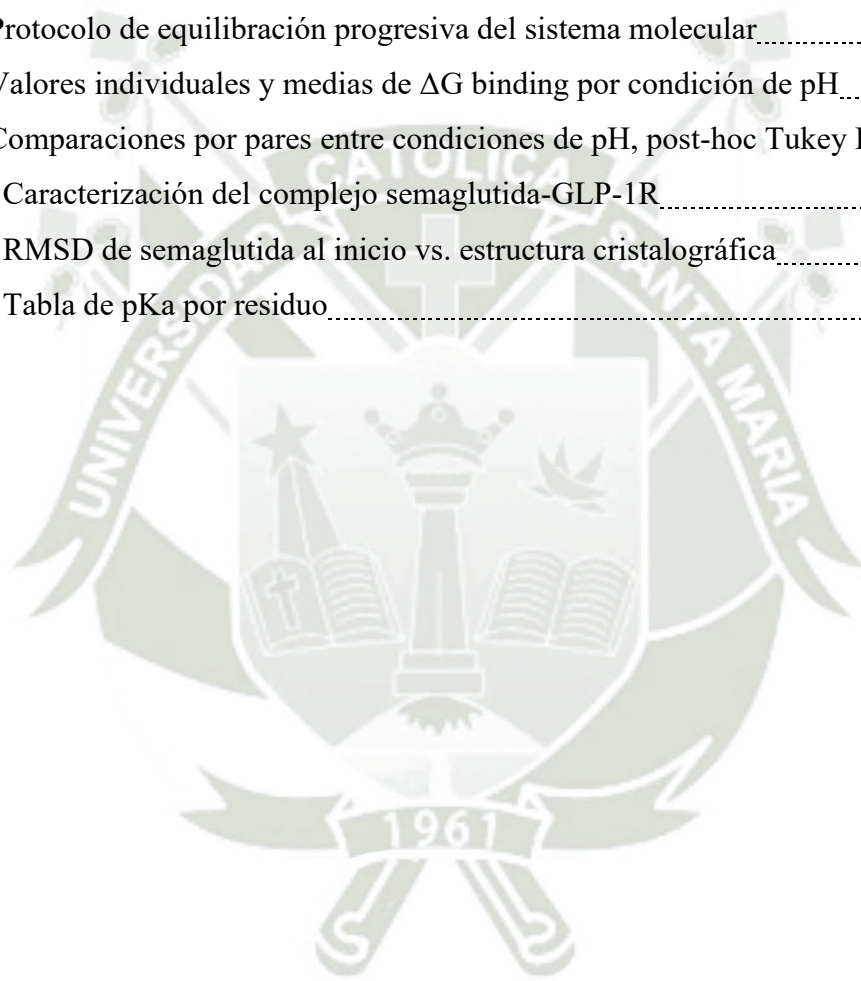
1.2. Instrumentos 22

1.3. Materiales de verificación 22

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN	23
2.1. Ámbito.....	23
2.2. Temporalidad	23
2.3. Unidades de estudio	23
2.4. Criterios de selección	23
3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	24
3.1. Organización	24
3.2. Recursos	29
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
1. RESULTADOS.....	31
1.1. Energía Libre de Unión MM-GBSA.....	32
1.2. Estabilidad Conformacional: RMSD, RMSF y Radio de Giro	35
1.3. Puentes de Hidrógeno en la Interfaz Semaglutida-GLP-1R.....	37
1.4. Identificación de Hotspots Farmacológicos pH-Sensibles.....	39
2. DISCUSIÓN.....	43
2.1. Alta afinidad residual a pH endosomal: el hallazgo central.....	43
2.2. El área postrema y el NTS: mecanismo neurológico de las náuseas	43
2.3. Implicancias clínicas y traslacionales	45
2.4. Experimentos mínimos de validación	46
2.5. Limitaciones del estudio.....	47
CONCLUSIONES.....	48
RECOMENDACIONES.....	49
REFERENCIAS	50
GLOSARIO	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables.....	6
Tabla 2. Parámetros del protocolo de simulación de dinámica molecular.....	32
Tabla 3. Energía libre de unión MM-GBSA del complejo semaglutida-GLP-1R.....	33
Tabla 4. ANOVA de una vía, ΔG binding por condición de pH.....	35
Tabla 5. Estado de protonación de las histidinas pH-sensibles del GLP-1R.....	38
Tabla 6. Hotspots farmacológicos del GLP-1R, ΔG pairwise por residuo.....	40
Tabla 7. Protocolo de equilibración progresiva del sistema molecular.....	58
Tabla 8. Valores individuales y medias de ΔG binding por condición de pH.....	59
Tabla 9. Comparaciones por pares entre condiciones de pH, post-hoc Tukey HSD.....	59
Tabla 10. Caracterización del complejo semaglutida-GLP-1R.....	61
Tabla 11. RMSD de semaglutida al inicio vs. estructura cristalográfica.....	62
Tabla 12. Tabla de pKa por residuo.....	65

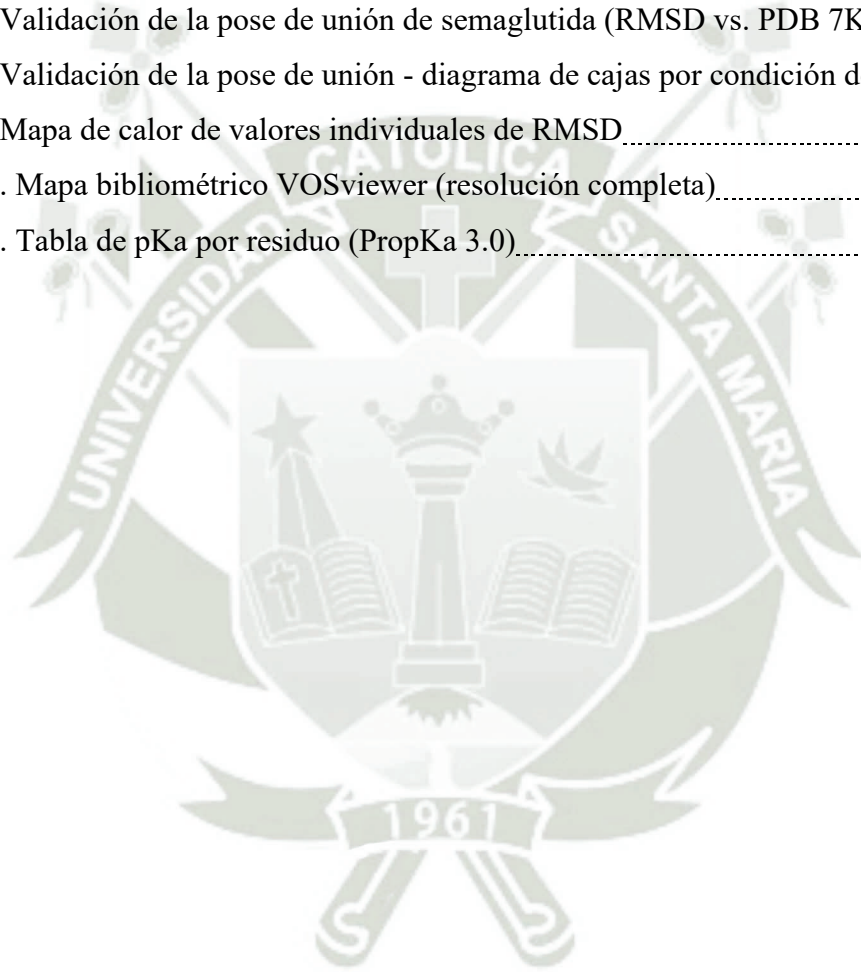


ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de co-ocurrencia de términos generado con vosviewer.....	10
Figura 2. Sistema molecular simulado: complejo semaglutida-GLP-1R.....	31
Figura 3. Energía libre de unión mm-gbsa del complejo semaglutida-GLP-1R.....	34
Figura 4. Estabilidad estructural del complejo semaglutida-GLP-1R.....	36
Figura 5. Número de puentes de hidrógeno en la interfaz semaglutida-GLP-1R.....	37
Figura 6. Estado de protonación de las histidinas del GLP-1R a pH 7.4 vs. pH 5.0.....	39
Figura 7. Contribución de van der waals por residuo del glp-1r en las tres pH.....	41
Figura 8. Residuos clave de la interfaz semaglutida-GLP-1R.....	42
Figura 9. Estructura tridimensional de semaglutida.....	42
Figura 10: Mecanismo neurológico del vómito mediado por el área postrema.....	44
Figura 11: Acceso de semaglutida al área postrema por vía sistémica.....	45
Figura A1. Flexibilidad local del receptor GLP-1R y de semaglutida por residuo.....	56
Figura A2. Distribución de la contribución VDW por residuo del núcleo hidrofóbico.....	57
Figura A3. RMSD backbone de semaglutida respecto a pdb 7KIO.....	62
Figura A4. Valores individuales de rmsd backbone de semaglutida y pH.....	63
Figura A5. Mapa bibliométrico de co-ocurrencia vosviewer.....	64

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Flexibilidad local por residuo (RMSF).....	56
Anexo 2. Distribución de hotspots por contribución VdW (gráfico lollipop).....	57
Anexo 3. Parámetros de equilibración (step6.1-step6.6).....	58
Anexo 4. Tablas medias y Tukey HSD adicionales.....	59
Anexo 5. Código fuente y archivos de simulación.....	60
Anexo 6. Caracterización del complejo semaglutida-GLP-1R.....	61
Anexo 7. Validación de la pose de unión de semaglutida (RMSD vs. PDB 7KI0).....	61
Anexo 8. Validación de la pose de unión - diagrama de cajas por condición de pH.....	62
Anexo 9. Mapa de calor de valores individuales de RMSD.....	63
Anexo 10. Mapa bibliométrico VOSviewer (resolución completa).....	64
Anexo 11. Tabla de pKa por residuo (PropKa 3.0).....	64



INTRODUCCIÓN

Durante las rotaciones clínicas en los servicios de endocrinología y medicina interna se evidencian con frecuencia dos problemas que se repiten: pacientes con DM2 que descompensaban su glucemia con cada infección intercurrente, y pacientes en consulta externa cuyos esquemas terapéuticos se han agotado y requieren alternativas más eficaces. En ese contexto, la semaglutida aparece en la literatura como el fármaco de mayor impacto disponible para el control simultáneo de glucemia y peso corporal. Su ingreso al mercado peruano es aún reciente y su disponibilidad está concentrada en centros especializados, pero la velocidad con que se está posicionando internacionalmente, y los primeros casos que llegan a consulta, hacen evidente que en pocos años formará parte del arsenal terapéutico habitual.

A nivel internacional, la carga epidemiológica de la DM2 y la obesidad constituye una de las principales amenazas para los sistemas de salud. Se estima que más de 537 millones de adultos padecen DM2 en el mundo, cifra proyectada a alcanzar los 783 millones para el año 2045. (1) En este contexto, los agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1R), y en particular la semaglutida, han demostrado reducciones clínicamente significativas de la HbA1c y del peso corporal en ensayos controlados de fase III, posicionándose como la terapia de mayor impacto en el manejo simultáneo de ambas condiciones. (2,3) Sin embargo, las náuseas representan el efecto adverso más frecuente, reportadas en el 43.9% de los pacientes con semaglutida 2.4 mg en el análisis agrupado STEP 1-3, frente al 16.1% del grupo placebo. (4)

Desde una perspectiva molecular, se ha demostrado que, tras la activación del GLP-1R por semaglutida a pH plasmático (~7.4), el complejo receptor-ligando es internalizado hacia compartimentos endosomales cuyo pH desciende hasta ~5.0. (5) Este ambiente ácido debería favorecer la disociación del complejo y el reciclaje del receptor; sin embargo, la alta afinidad de semaglutida podría impedir dicha disociación, favoreciendo la degradación del receptor y la desensibilización de la vía de señalización, lo que ha sido propuesto como sustrato molecular de la intolerancia gastrointestinal (6). Adicionalmente, la formulación oral emplea el excipiente SNAC (salcaprozato de sodio), que genera un microambiente alcalino localizado (pH ~8.0) directamente bajo la tableta en la mucosa gástrica, protegiendo al péptido de la degradación enzimática y facilitando su absorción por vía transcelular sin alterar las uniones estrechas (7). Esta tercera condición de pH tiene relevancia farmacológica directa.

En el contexto nacional y local, la semaglutida está ingresando progresivamente al mercado peruano, lo que hace relevante contar con modelos computacionales sobre el comportamiento molecular del complejo semaglutida-GLP-1R bajo distintas condiciones fisiológicas. El

Computational Biology and Chemistry Research Group (CBCRG) de la Universidad Católica de Santa María, con sede en Arequipa, ha desarrollado capacidades sólidas en dinámica molecular y bioinformática estructural que hacen viable este abordaje a escala local. A la fecha, ningún grupo de investigación peruano o latinoamericano ha publicado un estudio de dinámica molecular que evalúe el efecto del pH sobre el complejo semaglutida-GLP-1R.

Frente a este vacío del conocimiento, el presente estudio propone evaluar in silico la afinidad de unión y la estabilidad estructural del complejo semaglutida-GLP-1R bajo tres condiciones de pH biológicamente relevantes mediante simulaciones de dinámica molecular de 200 nanosegundos por réplica (1800 ns totales) con membrana lipídica explícita, complementadas con el cálculo de energía libre de unión por el método MM-GBSA. Los resultados permiten identificar los residuos del receptor más sensibles al pH y aportar bases moleculares para el diseño racional de análogos con mejor tolerabilidad gastrointestinal.

La presente investigación se desarrolla bajo un enfoque cuantitativo, de tipo básico con nivel molecular y traslacional, diseño experimental in silico, longitudinal y comparativo, empleando datos estructurales de dominio público y herramientas computacionales de acceso abierto, por lo que no requiere evaluación por comité de ética con participantes humanos ni animales.



CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Determinación del Problema

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la obesidad son dos de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Su prevalencia ha crecido de forma sostenida en las últimas décadas y se asocia a complicaciones cardiovasculares, renales y neuropáticas que incrementan significativamente la morbilidad y el gasto sanitario (1,8,9). En este contexto, los agonistas del GLP-1R, en especial la semaglutida, han emergido como la opción terapéutica de mayor eficacia disponible actualmente, con capacidad de reducir la HbA1c y el peso corporal de forma simultánea y sostenida (2,3).

Los ensayos clínicos de fase III reportan de manera consistente que las náuseas, el vómito y la intolerancia gastrointestinal constituyen la principal causa de abandono del tratamiento con semaglutida, con náuseas reportadas en el 43.9% de los pacientes en los ensayos STEP 1-3, la tasa más alta entre los efectos adversos gastrointestinales (4). Aunque estos efectos adversos han sido atribuidos de forma general a la activación del GLP-1R en el área postrema del tronco encefálico, el mecanismo molecular subyacente a la intolerancia gastrointestinal específica de semaglutida, en contraste con otros agonistas del GLP-1R de menor duración de acción, no ha sido completamente elucidado.

Estudios recientes han demostrado que el GLP-1R, tras ser activado por su ligando en la membrana plasmática, es internalizado hacia compartimentos endosomales cuyo pH desciende progresivamente hasta valores de 5.0 (5). En condiciones normales, este ambiente ácido favorece la disociación del complejo ligando-receptor, permitiendo el reciclaje del receptor hacia la membrana y la terminación de la señal. Sin embargo, la excepcional afinidad de semaglutida por el GLP-1R, conferida por sus modificaciones moleculares respecto al GLP-1 nativo, podría impedir esta disociación en el endosoma ácido, resultando en una señalización endosomal prolongada y una mayor desensibilización del receptor por degradación lisosomal (6). Este mecanismo ha sido propuesto como una explicación plausible para la mayor tasa de intolerancia gastrointestinal observada con semaglutida frente a agonistas de vida media más corta.

Paralelamente, la formulación oral de semaglutida emplea el excipiente salcaprozato de sodio (SNAC; sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino] caprylate), que genera un microambiente alcalino localizado (pH ~8.0) en la mucosa gástrica para proteger al péptido de la degradación enzimática y facilitar su absorción transcelular (7).

A pesar de la relevancia clínica de estos tres escenarios de pH (7.4 sistémico, 5.0 endosomal y 8.0 inducido por SNAC), no existen a la fecha estudios de dinámica molecular (DM) que evalúen de manera sistemática y comparativa su efecto sobre la estabilidad conformacional y la energía de unión del complejo semaglutida-GLP-1R en un entorno de membrana lipídica explícita. Cubrir este vacío del conocimiento es el propósito central del presente trabajo.

1.2. Enunciado del Problema

¿Cuál es el efecto de las variaciones de pH (7.4 sistémico, 5.0 endosomal y 8.0 inducido por SNAC) sobre la afinidad de unión, la estabilidad estructural y la plausibilidad de señalización endosomal del complejo semaglutida-GLP-1R en simulaciones de dinámica molecular con membrana lipídica explícita, y cuáles son sus posibles implicancias en la tolerancia clínica?

1.3. Descripción del Problema

1.3.1. Área del conocimiento

Área general: Ciencias de la Salud

Área específica: Farmacología y Bioquímica

Especialidad: Farmacología Computacional y Bioinformática Estructural

Línea de investigación: Diseño racional de fármacos mediante simulaciones de dinámica molecular

1.3.2. Análisis de Variables

Tabla 1. Operacionalización de variables

VARIABLE	TIPO	INDICADORES	UNIDAD / CATEGORÍA	ESCALA
pH del sistema de simulación	Independiente	Condición de protonación asignada mediante PropKa 3.0	pH 5.0 / pH 7.4 / pH 8.0	Ordinal
Estabilidad estructural (RMSD)	Dependiente	Desviación cuadrática media de posición atómica respecto al frame inicial	nm	Razón
Fluctuación por residuo (RMSF)	Dependiente	Fluctuación media de posición atómica por residuo a lo largo de la trayectoria	nm	Razón
Puentes de hidrógeno	Dependiente	Número de puentes de hidrógeno intermoleculares (receptor-ligando) por frame	Número (adimensional)	Razón
Energía libre de unión (ΔG binding)	Dependiente	Energía libre de unión calculada por MM-GBSA sobre frames 3000-4000 (150-200 ns)	kcal·mol ⁻¹	Razón
Contribución energética por residuo	Dependiente	Descomposición pairwise de ΔG por residuo del receptor (idecomp=2)	kcal·mol ⁻¹ por residuo	Razón

1.3.3. Tipo de investigación

Básica, in silico. No se manipulan variables clínicas ni se interviene en sistemas biológicos vivos. El estudio analiza datos computacionales generados a partir de estructuras cristalográficas de dominio público mediante simulaciones de dinámica molecular.

1.3.4. Nivel de investigación

Relacional-comparativo con nivel molecular y traslacional. Se evalúa la dirección y magnitud de la asociación entre la condición de pH y los parámetros de estabilidad y afinidad del complejo semaglutida-GLP-1R, sin establecer causalidad directa en sistemas biológicos.

1.3.5. Diseño de investigación

Experimental in silico, longitudinal, comparativo, con réplicas independientes. Se emplean tres réplicas de simulación por condición de pH (n=3 por grupo) con verificación de convergencia mediante análisis de bloques de 50 ns.

1.3.6. Interrogantes

Interrogante principal:

¿Cuál es el efecto de las variaciones de pH (7.4 sistémico, 5.0 endosomal y 8.0 inducido por SNAC) sobre la estabilidad estructural y la energía libre de unión del complejo semaglutida-GLP-1R en simulaciones de dinámica molecular con membrana lipídica explícita?

Interrogantes secundarias:

1. ¿Cómo varía la energía libre de unión MM-GBSA del complejo semaglutida-GLP-1R entre las condiciones de pH 5.0 (endosomal), 7.4 (sistémico) y 8.0 (inducido por SNAC)?
2. ¿Cuál es el efecto de las variaciones de pH sobre la estabilidad conformacional del complejo semaglutida-GLP-1R, evaluada mediante RMSD, RMSF y radio de giro?
3. ¿Cómo afecta la protonación de las histidinas del GLP-1R a pH 5.0 al número de puentes de hidrógeno en la interfaz semaglutida-GLP-1R?
4. ¿Qué residuos del GLP-1R actúan como hotspots farmacológicos con contribución energética dependiente del pH, y cuál es su potencial como dianas para el rediseño racional de análogos con mejor tolerabilidad?
5. ¿Apoya la alta afinidad residual del complejo a pH endosomal la plausibilidad computacional de una señalización endosomal más persistente como sustrato molecular de la intolerancia gastrointestinal a semaglutida?

1.4. Justificación del problema

1.4.1. Relevancia Científica

La comprensión de los mecanismos moleculares que gobiernan la interacción semaglutida-GLP-1R bajo diferentes condiciones de pH tiene valor científico directo para el campo de la farmacología computacional y el diseño racional de fármacos. Actualmente, la mayoría de los estudios de dinámica molecular de GPCRs se realizan a pH neutro y en ausencia de membrana lipídica explícita, condiciones que no replican fielmente el microambiente endosomal o gastrointestinal al que está sometido el complejo semaglutida-GLP-1R in vivo (10,11). El presente estudio aporta un modelo computacional validado con datos estructurales de alta resolución (12) y un campo de fuerzas optimizado para sistemas proteína-membrana (CHARMM36m) (13), que puede servir como referencia metodológica para estudios similares con otros péptidos terapéuticos de la misma familia farmacológica.

1.4.2. Relevancia Social

La DM2 y la obesidad afectan a millones de personas en el mundo y representan una carga económica y social creciente para los sistemas de salud (1,8,9). La semaglutida, con su demostrada capacidad de reducir peso y controlar la glucemia, tiene el potencial de mejorar significativamente la calidad de vida de estos pacientes. Sin embargo, el abandono del tratamiento por intolerancia gastrointestinal limita su impacto poblacional (14). Identificar los determinantes moleculares de dicha intolerancia puede contribuir, a largo plazo, al diseño de análogos del GLP-1R con mejor perfil de tolerabilidad, lo que beneficiaría directamente a la población de pacientes que más necesita este tipo de terapias.

1.4.3. Relevancia Contemporánea

La aprobación de semaglutida oral (Rybelsus®) y de la formulación de alta dosis para obesidad (Wegovy®) por la FDA ha generado un creciente interés científico y clínico en esta molécula. Su uso se está expandiendo rápidamente a nivel global, incluyendo nuevas indicaciones cardiovasculares aprobadas en 2023 (15). En este contexto, comprender mejor su comportamiento molecular en los distintos compartimentos biológicos por los que transita es una pregunta científica actual y de alta relevancia traslacional.

1.4.4. Originalidad

Este estudio es el primero en evaluar comparativamente el efecto de tres condiciones de pH biológicamente relevantes sobre el complejo semaglutida-GLP-1R en un sistema de

membrana lipídica explícita mediante dinámica molecular de largo alcance. Los estudios computacionales previos sobre GLP-1R se han realizado predominantemente a pH neutro y sin membrana, o han abordado otros agonistas peptídicos. Ningún grupo de investigación peruano o latinoamericano ha publicado previamente un estudio de este tipo para este complejo específico.

1.4.5. Análisis Bibliométrico: Evidencia del Nicho de Investigación

Con el fin de objetivar el nicho de investigación, se realizó un análisis bibliométrico de co-ocurrencia de términos en PubMed empleando el tesauro estructurado: ("Semaglutide" OR "GLP-1 receptor") AND ("Obesity" OR "Type 2 Diabetes") AND ("Molecular Dynamics" OR "in silico" OR "endosome" OR "pH" OR "structure"). Los resultados fueron procesados con VOSviewer versión 1.6.20. El análisis identificó 3 clústeres temáticos principales con 48 enlaces entre nodos y una fortaleza total de 433 vínculos sobre una base de 75 ocurrencias del término central (semaglutida).

El mapa de co-ocurrencia (Figura 1) revela tres regiones temáticas diferenciadas: el clúster rojo agrupa los términos vinculados al estudio estructural y computacional del complejo; el clúster verde concentra la investigación clínica sobre resultados en DM2, obesidad y enfermedades cardiovasculares; el clúster azul reúne los estudios de eficacia comparada. La posición marginal y el escaso peso relativo de los nodos del clúster rojo evidencian que la intersección entre la investigación estructural-computacional de semaglutida y el eje temático pH/endosoma constituye un nicho bibliométricamente subrepresentado.

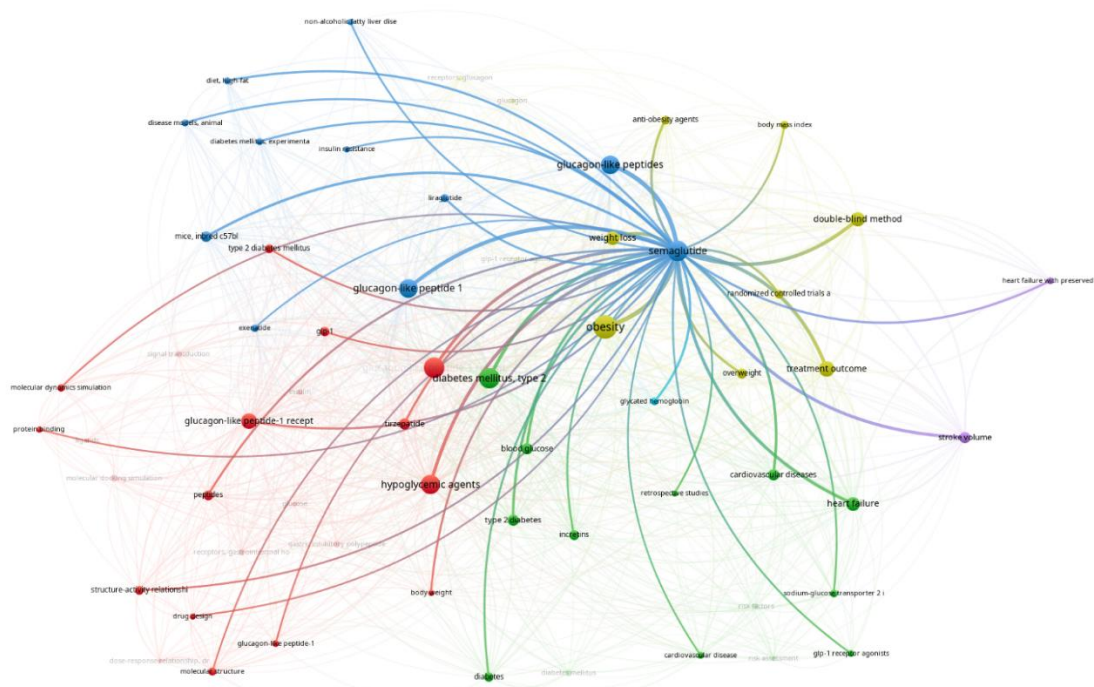


Figura 1: Mapa de co-ocurrencia de términos clave sobre semaglutida generado con VOSviewer (PubMed, n = 75 ocurrencias). El tamaño de los nodos es proporcional a la frecuencia de aparición; el color identifica el clúster temático: rojo = investigación estructural y computacional del receptor; verde = resultados clínicos en DM2 y obesidad; azul = ensayos comparativos de eficacia. La baja densidad de conexiones del clúster rojo confirma que la intersección entre dinámica molecular del GLP-1R y el eje pH/endosoma representa un nicho bibliométrico subrepresentado.

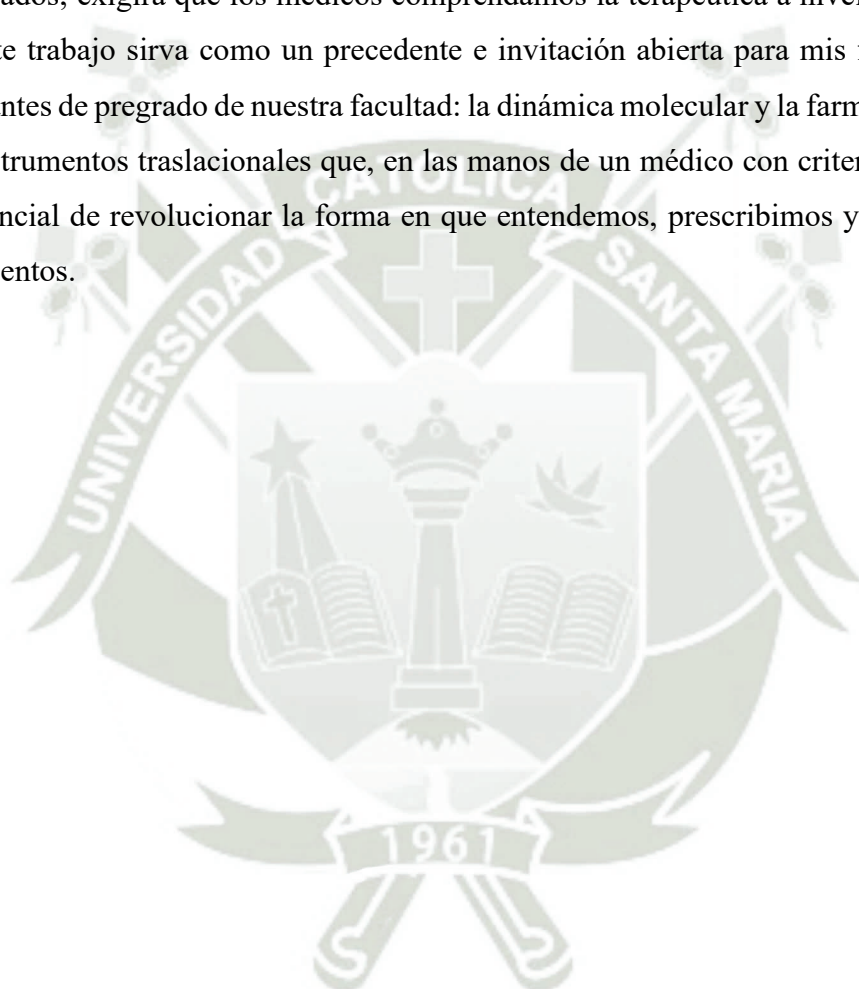
1.4.6. Interés Personal

Mi interés por la farmacología computacional nació desde el primer año de la carrera, cursada paralelamente junto a otra formación universitaria, cuando comencé a notar que los libros de texto explicaban muy bien qué hace un medicamento, pero pocas veces mostraban cómo lo hace a nivel molecular. Esa inquietud me llevó, hace aproximadamente dos años, a unirme al Computational Biology and Chemistry Research Group (CBCRG) de la facultad, donde tuve la oportunidad de aprender que existen herramientas computacionales capaces de simular, átomo por átomo, cómo una molécula interactúa con su receptor en condiciones que se asemejan a las del cuerpo humano.

La elección de la semaglutida como objeto de estudio surgió del impacto que este medicamento ha tenido en las redes sociales y en la opinión pública: millones de personas lo utilizan o debaten su uso para bajar de peso, lo que despertó en mí la curiosidad por

comprender su mecanismo de acción a nivel molecular y por qué, siendo tan eficaz, una proporción considerable de pacientes no lo tolera. Al llegar a los servicios de medicina interna y endocrinología durante las rotaciones clínicas, esa pregunta teórica cobró dimensión práctica al ver pacientes que batallaban para llegar a nivel de glucosa estables o muchas de las complicaciones por el mal control de la enfermedad.

La medicina del futuro ya no se basará únicamente en la observación clínica y los ensayos controlados; exigirá que los médicos comprendamos la terapéutica a nivel atómico. Espero que este trabajo sirva como un precedente e invitación abierta para mis futuros colegas y estudiantes de pregrado de nuestra facultad: la dinámica molecular y la farmacología in silico son instrumentos traslacionales que, en las manos de un médico con criterio clínico, tienen el potencial de revolucionar la forma en que entendemos, prescribimos y optimizamos los tratamientos.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar in silico el efecto de las variaciones de pH (5.0 endosomal, 7.4 sistémico y 8.0 inducido por SNAC) sobre la afinidad de unión y la estabilidad estructural del complejo semaglutida-GLP-1R en un sistema de membrana lipídica POPC explícita, y discutir la plausibilidad de señalización endosomal sostenida como posible sustrato molecular de la intolerancia gastrointestinal asociada a semaglutida.

2.2. Objetivos Específicos

1. Calcular la energía libre de unión MM-GBSA del complejo semaglutida-GLP-1R bajo las condiciones de pH 5.0, 7.4 y 8.0, y comparar el patrón relativo entre condiciones.
2. Analizar la estabilidad conformacional del complejo mediante RMSD, RMSF y radio de giro en las tres condiciones de pH, validando la convergencia de las trayectorias.
3. Cuantificar los puentes de hidrógeno en la interfaz semaglutida-GLP-1R bajo las tres condiciones de pH y relacionar los cambios observados con el estado de protonación de las histidinas del receptor.
4. Identificar los hotspots farmacológicos del GLP-1R con sensibilidad al pH mediante descomposición energética pairwise por residuo, y proponer candidatos para el diseño racional de análogos con perfil pH-dependiente mejorado.
5. Discutir la plausibilidad biológica del vínculo entre la afinidad residual endosomal observada y la intolerancia gastrointestinal reportada clínicamente, reconociendo las limitaciones metodológicas inherentes al estudio in silico.

3. HIPÓTESIS

Las variaciones de pH (5.0 endosomal, 7.4 sistémico y 8.0 inducido por SNAC) modifican el estado de protonación de las histidinas del GLP-1R y, con ello, la estabilidad conformacional y la energía libre de unión del complejo semaglutida-GLP-1R. Se hipotetiza que a pH endosomal (5.0) la afinidad residual del complejo podría ser termodinámicamente compatible con una disociación más lenta del ligando, lo cual aportaría plausibilidad computacional a la hipótesis de señalización endosomal sostenida como posible sustrato molecular de la intolerancia gastrointestinal a semaglutida.



4. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

4.1.A Nivel Internacional

- Deganutti et al. (2022) "Dynamics of GLP-1R peptide agonist engagement are correlated with kinetics of G protein activation." *Nature Communications* (16).

En este estudio se realizaron simulaciones de dinámica molecular de microsegundos del complejo GLP-1R con distintos agonistas peptídicos para correlacionar los patrones de unión con la cinética de activación de la proteína G. Los autores identificaron que la velocidad de asociación del péptido al receptor y la estabilidad del complejo formado son determinantes clave de la eficacia funcional del agonista. Este trabajo es relevante como antecedente metodológico y como fuente de validación de residuos de contacto en el GLP-1R.

- Manchanda et al. (2023) "Enhanced Endosomal Signaling and Desensitization of GLP-1R vs GIPR in Pancreatic Beta Cells." *Endocrinology* (6).

Este estudio experimental demostró en células beta pancreáticas que el GLP-1R produce una señalización endosomal más prolongada y una mayor desensibilización que el receptor de GIP (GIPR), y que este diferencial se debe a la mayor afinidad residual del GLP-1R por sus ligandos en el ambiente ácido del endosoma. Constituye el respaldo experimental más directo de la hipótesis central de este trabajo de tesis.

- Fang et al. (2020) "Ligand-Specific Factors Influencing GLP-1 Receptor Post-Endocytic Trafficking and Degradation in Pancreatic Beta Cells." *International Journal of Molecular Sciences* (5).

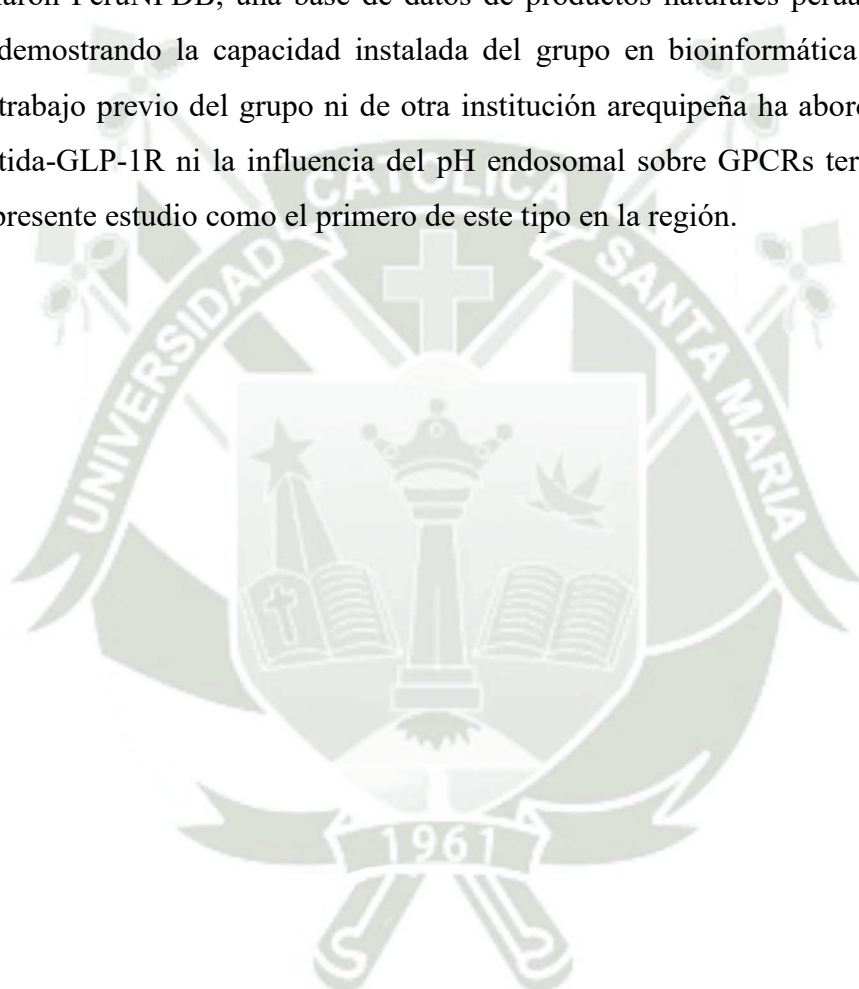
Estudio experimental que demostró que el destino postendocítico del GLP-1R (reciclaje vs degradación lisosomal) depende de la identidad del ligando unido. Los agonistas de mayor afinidad, como los análogos de GLP-1 de larga duración, favorecen la degradación lisosomal del receptor y la consiguiente desensibilización de la vía de señalización. Este trabajo aporta la base celular de la hipótesis desarrollada en esta tesis.

- Agarwal & Haworth (2025) "Oral absorption of semaglutide: pharmacokinetic modeling and molecular dynamics simulations." *In Silico Pharmacology* (17).

Estudio computacional reciente que combina modelado farmacocinético y simulaciones de dinámica molecular para estudiar el proceso de absorción oral de semaglutida en presencia de SNAC. Aunque no evalúa las condiciones de pH endosomal ni utiliza membrana lipídica explícita, representa el antecedente computacional más cercano al presente trabajo y confirma la relevancia del pH gástrico para el comportamiento molecular de semaglutida.

4.2.A Nivel Nacional y Local

El grupo CBCRG de la Universidad Católica de Santa María, con sede en Arequipa, ha publicado dos trabajos directamente relevantes como antecedentes locales. Barazorda-Ccahuana et al. (2021) evaluaron el efecto del pH ácido sobre la proteasa principal del SARS-CoV-2 mediante dinámica molecular, estableciendo el protocolo de simulación multi-pH que es la base metodológica del presente trabajo (18). Barazorda-Ccahuana et al. (2023) desarrollaron PeruNPDB, una base de datos de productos naturales peruanos para cribado virtual, demostrando la capacidad instalada del grupo en bioinformática estructural (19). Ningún trabajo previo del grupo ni de otra institución arequipeña ha abordado el complejo semaglutida-GLP-1R ni la influencia del pH endosomal sobre GPCRs terapéuticos, lo que sitúa el presente estudio como el primero de este tipo en la región.



5. MARCO TEÓRICO

5.1. Diabetes Mellitus Tipo 2 y Obesidad: Epidemiología y Fisiopatología

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por resistencia a la insulina e hiperglucemia sostenida (8). Su prevalencia ha aumentado de manera alarmante en las últimas décadas: en el año 2021 se estimaban más de 537 millones de personas afectadas en el mundo, y las proyecciones indican que para el año 2045 esta cifra podría alcanzar los 783 millones si no se implementan medidas efectivas de prevención (9).

La obesidad y la DM2 están estrechamente relacionadas. El exceso de tejido adiposo, especialmente el adiposo visceral, genera un estado de inflamación crónica de bajo grado y libera ácidos grasos libres que interfieren con la señalización de la insulina en el músculo, el hígado y el páncreas (1). Este ciclo vicioso hace que la obesidad sea el principal factor de riesgo modificable para desarrollar DM2, y explica por qué las intervenciones que logran una reducción significativa del peso corporal tienen un impacto tan relevante en el control de la enfermedad (8). En el Perú, la combinación de cambios en los hábitos alimentarios y el sedentarismo ha incrementado la prevalencia de ambas condiciones, convirtiendo su manejo en un desafío prioritario para el sistema de salud nacional.

La DM2 no controlada genera complicaciones graves, nefropatía, retinopatía, neuropatía y enfermedad cardiovascular, que representan la principal causa de morbilidad evitable en adultos (9). Este panorama justifica la búsqueda continua de opciones terapéuticas más eficaces, que no solo reduzcan la glucemia sino que también actúen sobre los factores de riesgo cardiovascular y metabólico de forma simultánea.

5.2. El Receptor GLP-1R: Estructura, Función y Relevancia Terapéutica

El receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1R) es una proteína de membrana que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) de clase B. Los GPCRs constituyen el blanco terapéutico de aproximadamente el 34% de todos los medicamentos aprobados por la FDA (10). El GLP-1R se expresa principalmente en las células beta del páncreas, pero también en el corazón, los riñones, el intestino y diversas regiones del sistema nervioso central, incluyendo el hipotálamo y el área postrema del tronco encefálico (20).

Cuando es activado por su ligando natural (el péptido GLP-1, secretado por las células L del intestino delgado en respuesta a la ingesta de alimentos), el GLP-1R estimula la secreción

de insulina por el páncreas de manera dependiente de glucosa, es decir, solo cuando la glucemia está elevada, lo que reduce el riesgo de hipoglucemia, inhibe la secreción de glucagón, enlentece el vaciamiento gástrico y envía señales de saciedad al cerebro (20). Este conjunto de efectos lo convierte en una diana terapéutica de gran valor para el tratamiento simultáneo de la DM2 y la obesidad.

Un aspecto especialmente relevante es el comportamiento del GLP-1R tras la activación. Al igual que la mayoría de los GPCRs, el GLP-1R activado es internalizado: la célula lo recoge desde la membrana plasmática y lo introduce en vesículas intracelulares llamadas endosomas, cuyo interior tiene un pH progresivamente más ácido (desde ~6.5 en endosomas tempranos hasta ~5.0 en endosomas tardíos) (5). En condiciones normales, este ambiente ácido favorece que el ligando se disocie del receptor, permitiendo que el receptor regrese a la membrana plasmática y esté disponible para una nueva ronda de activación. Cuando el ligando no se disocia, como puede ocurrir con semaglutida por su alta afinidad, el receptor es dirigido hacia los lisosomas, donde es degradado (6). Este mecanismo tiene consecuencias directas sobre la intensidad y duración de la respuesta farmacológica y, según la hipótesis central de este estudio, sobre la tolerancia gastrointestinal al fármaco.

5.3. Semaglutida: Farmacología, Modificaciones Moleculares y Absorción Oral

La semaglutida es un agonista del GLP-1R de segunda generación, desarrollado por Novo Nordisk y aprobado por la FDA inicialmente para el tratamiento de la DM2 (Ozempic®, 2017) y posteriormente para el manejo del peso corporal en adultos con obesidad (Wegovy®, 2021). (15) A diferencia del GLP-1 natural, que tiene una vida media de apenas 2 minutos, la semaglutida ha sido diseñada con tres modificaciones moleculares estratégicas que extienden su vida media a aproximadamente 168 horas, permitiendo una administración semanal: sustitución Ala8→AIB (resistencia a DPP-4), adición de una cadena grasa C18 para unión a albúmina y circulación prolongada, y cambio Lys34→Arg para estabilizar la estructura (15).

La eficacia clínica de la semaglutida ha sido demostrada de forma robusta en los ensayos del programa STEP. En el STEP 5, los pacientes tratados con semaglutida 2.4 mg semanal durante 104 semanas lograron una reducción media del peso corporal del 15.2% frente al 2.6% del grupo placebo (2). Sin embargo, el mismo ensayo reportó que el 82.2% de los pacientes en el grupo semaglutida experimentó efectos adversos gastrointestinales frente al 53.9% del grupo placebo (2). En el análisis agrupado STEP 1-3, la náusea fue el síntoma

más frecuente, reportada en el 43.9% de los participantes con semaglutida frente al 16.1% del grupo placebo (4).

La formulación oral (Rybelsus®) emplea el excipiente SNAC (salcaprozato de sodio; sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino] caprylate), que genera un microambiente alcalino localizado (pH ~8.0) directamente bajo la tableta, en la superficie de la mucosa gástrica. Este gradiente de pH local protege a la semaglutida de la degradación por pepsina y facilita su absorción por vía transcelular a través del epitelio gástrico, sin alterar las uniones estrechas intercelulares (7,21). Este escenario de pH alcalino en la mucosa gástrica durante la absorción oral constituye la tercera condición de pH estudiada en este trabajo.

5.4.El Área Postrema y la Intolerancia Gastrointestinal a los Agonistas GLP-1R

El área postrema (AP) es una estructura bilateral localizada en el suelo del cuarto ventrículo, en la porción caudal del bulbo raquídeo (médula oblongada). A diferencia de la gran mayoría de las estructuras del sistema nervioso central, el AP carece de barrera hematoencefálica efectiva: sus capilares fenestrados permiten el acceso directo de moléculas circulantes en sangre al tejido nervioso, característica que lo define como uno de los principales órganos circunventriculares y como el principal sensor quimiorreceptor del sistema nervioso ante toxinas y fármacos circulantes (14).

El AP expresa densamente el GLP-1R en subpoblaciones neuronales específicas que median los efectos de saciedad y los comportamientos asociados a náuseas (22). Cuando la semaglutida circula en plasma y atraviesa los capilares fenestrados del AP, se une a los GLP-1R de estas neuronas y activa la señalización intracelular. En condiciones fisiológicas normales, esta activación, breve y transitoria con agonistas de vida media corta como el GLP-1 endógeno, es parte de la señalización de saciedad. Sin embargo, con semaglutida, cuya vida media de ~168 horas mantiene concentraciones plasmáticas elevadas de forma sostenida semana a semana, la estimulación del AP es cualitativamente diferente: prolongada, con internalizaciones repetidas y acumulación de complejos semaglutida-GLP-1R en compartimentos endosomales de las neuronas del AP.

Según la hipótesis mecanística sustentada en los resultados del presente estudio, a pH 5.0 endosomal, semaglutida mantiene una afinidad de $\Delta G \sim -105.60 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, valor termodinámicamente compatible con la persistencia del complejo en el entorno endosomal ácido, aunque la demostración directa de disociación inhibida requiere validación experimental. En las neuronas del AP, esta señalización activa preferentemente vías de β -arrestina que, a diferencia de la señalización clásica por proteína Gs, generan excitación

neuronal persistente de los centros del vómito en el Núcleo del Tracto Solitario (23). El resultado clínico son las náuseas y el vómito que los pacientes reportan, especialmente durante la fase de escalada de dosis, cuando la densidad de receptores internalizados con ligando retenido es mayor.

Esta cadena de eventos, alta afinidad plasmática → internalización → afinidad residual endosomal → señalización sostenida en el AP → activación del centro del vómito, constituye la hipótesis mecanística que motiva el presente estudio. El abordaje computacional evalúa el primer eslabón (afinidad endosomal); los eslabones posteriores requieren validación experimental directa. La comprensión de este circuito es especialmente relevante para la práctica clínica porque permite anticipar que la intolerancia gastrointestinal es mayor en la fase inicial del tratamiento y con la formulación inyectable de alta dosis, ambos escenarios de máxima exposición del AP a semaglutida circulante.

5.5. Dinámica Molecular: Principios y Aplicación al Estudio de GPCRs

La dinámica molecular (DM) es una técnica computacional que permite simular el movimiento de los átomos de una molécula a lo largo del tiempo, siguiendo las leyes de la mecánica clásica de Newton en pasos de femtosegundos. La trayectoria resultante permite cuantificar estabilidad conformacional, flexibilidad e interacciones bajo condiciones controladas de temperatura, presión y pH.

En este trabajo se utilizó CHARMM36m, un campo de fuerzas desarrollado específicamente para simular proteínas en entornos de membrana lipídica, que ha demostrado ser especialmente preciso para el estudio de GPCRs (13). El software de simulación empleado fue GROMACS 2025.3, uno de los programas de dinámica molecular de mayor uso en la comunidad científica internacional, distribuido bajo licencia de código abierto (24).

La simulación de GPCRs como el GLP-1R presenta desafíos técnicos particulares porque estos receptores están embebidos en la membrana celular. En este trabajo, el complejo semaglutida-GLP-1R fue insertado en una bicapa de lípidos POPC (1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina), que es el lípido más abundante en la membrana plasmática de células de mamífero (11). El sistema completo incluyó el receptor con su ligando, la bicapa lipídica, moléculas de agua y iones de sodio y cloro a concentración fisiológica, totalizando un sistema de aproximadamente 80,000-100,000 átomos.

Para cuantificar la afinidad de unión bajo cada condición de pH, se empleó el método MM-GBSA (Mecánica Molecular con Superficie de Born Generalizada y Área de Superficie).

Este método calcula la energía libre de unión estimando las contribuciones energéticas de las interacciones entre el receptor y el ligando, descontando la energía necesaria para desolvatar cada molécula al formarse el complejo (25). Adicionalmente, se realizó una descomposición energética por residuo (método pairwise, idecomp=2), que permite identificar qué aminoácidos específicos del receptor contribuyen más a la estabilidad del complejo en cada condición de pH, los llamados "hotspots", información de gran valor para el diseño de análogos mejorados.





CAPÍTULO II
MATERIAL Y MÉTODOS

1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

1.1.Técnicas

Simulación de dinámica molecular clásica (DM) con campo de fuerzas CHARMM36m en entorno de membrana lipídica POPC explícita, análisis de trayectorias mediante métricas estructurales (RMSD, RMSF, Rg, puentes de hidrógeno) y estimación de energía libre de unión mediante el método MM-GBSA con descomposición energética por residuo.

1.2.Instrumentos

Los instrumentos de recolección de datos son los archivos de trayectoria (.xtc) y de energía (.edr) generados por GROMACS 2025.3 para cada sistema simulado. El análisis se realiza de forma automatizada mediante scripts de bash (GROMACS) y R (versión 4.3), con los paquetes ggplot2, dplyr, tidyr, flextable y patchwork para visualización y presentación de resultados.

1.3.Materiales de verificación

- Estructura cristalográfica del complejo GLP-1R-semaglutida: PDB ID 7KI0 (Zhang et al., 2021) (12).
- Software GROMACS versión 2025.3 (distribución conda-forge) (24).
- Campo de fuerzas CHARMM36m. doi:10.1038/nmeth.4067
- CHARMM-GUI Membrane Builder (Jo et al., 2008; Jo et al., 2009) (26,27).
- gmx_MMPBSA v1.6.4 (Valdés-Tresanco et al., 2021) (25).
- Workstation CBCRG-UCSM: CPU Intel Core i9-14900K (24 núcleos), GPU NVIDIA RTX 4090 (24 GB VRAM), 128 GB RAM DDR5, Ubuntu Linux.

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN

2.1.Ámbito

Laboratorio computacional del Computational Biology and Chemistry Research Group (CBCRG), Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú.

2.2.Temporalidad

Período de simulación y análisis: febrero 2026, marzo 2026. Redacción final: marzo de 2026.

2.3.Unidades de estudio

Cada unidad de estudio es una trayectoria de dinámica molecular de 200 nanosegundos del complejo semaglutida-GLP-1R en membrana POPC, generada bajo una condición de pH específica (5.0, 7.4 u 8.0). Se realizaron 3 réplicas independientes por condición, totalizando 9 unidades de estudio con una densidad total de simulación de 1800 ns.

2.4.Criterios de selección

2.1.1. Criterios de inclusión

- Trayectorias que alcanzan los 200 ns de simulación completos (100,000,000 pasos con $dt = 0.002$ ps).
- Trayectorias con RMSD del complejo que alcanza convergencia ($\Delta < 0.05$ nm entre bloques consecutivos de 50 ns).
- Sistemas con conservación de energía total y temperatura estables (desviación < 2 K respecto a 310.15 K).

2.1.2. Criterios de exclusión

- Trayectorias con ruptura de la bicapa lipídica o disociación espontánea del complejo semaglutida-GLP-1R antes de los 100 ns.
- Trayectorias con errores de integración o convergencia en el análisis MM-GBSA (energías > 0 kcal·mol⁻¹).

3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.1. Organización

3.1.1. Características del complejo molecular estudiado

El sistema molecular estudiado consiste en el complejo entre semaglutida, péptido sintético análogo de GLP-1(7-37) con 31 aminoácidos en su secuencia canónica (30 resueltos en PDB 7KI0, posiciones 7-36; Gly37 no resuelto por flexibilidad del extremo C-terminal en cryo-EM), peso molecular de 4,113.58 Da, con sustitución Ala⁸→AIB, cadena grasa C18 conjugada a Lys26 para unión a albúmina y cambio Lys³⁴→Arg, y el receptor GLP-1R, GPCR de clase B1 de 463 aminoácidos (~53 kDa) con siete hélices transmembrana y dominio N-terminal extracelular de ~120 residuos,. La estructura de partida fue PDB 7KI0 (cryo-EM, 2.5 Å, Zhang et al. 2021 [12]). Nota: la cadena grasa C18 de semaglutida no fue incluida en el modelo dado que no está resuelta en PDB 7KI0 y no forma parte de la interfaz de unión con el GLP-1R (ver Limitaciones). Tras la preparación con CHARMM-GUI, el sistema completo incluyó ~86,789 átomos en una caja ortorrómbica de 7.7 × 7.7 × 15.5 nm (Tabla 10, Anexo 6).

3.1.2. Preparación del Sistema Molecular

La estructura de partida se obtuvo del Protein Data Bank (PDB ID: 7KI0), correspondiente a la estructura de criomicroscopía electrónica del complejo GLP-1R activado con semaglutida y proteína Gs, resuelta a 2.5 Å (12). Se extrajo el receptor GLP-1R (cadena R) con semaglutida (cadena P), eliminando los componentes de la proteína Gs y los residuos de nanobody. Los residuos faltantes 29-36 del receptor fueron identificados mediante comparación entre la secuencia canónica depositada en UniProt (GLP1R_HUMAN, P43220) y la secuencia resuelta en 7KI0, y reconstruidos con la función *Model Missing Residues* de CHARMM-GUI. El residuo AIB (ácido alfa-aminoisobutírico) en la posición 8 de semaglutida fue reconocido automáticamente por CHARMM-GUI a partir de los parámetros estándar de CHARMM36m. La cadena grasa C18 de semaglutida no fue modelada dado que no está resuelta en PDB 7KI0 y no forma parte de la interfaz de unión con el GLP-1R (ver Limitaciones).

La orientación del receptor en la membrana fue determinada mediante el servidor PPM 2.0. El sistema se construyó con CHARMM-GUI Membrane Builder (26,27) usando una bicapa homogénea de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina), modelo validado para simulaciones de GPCRs en membrana plasmática (28), con 140 lípidos totales (70 por hoja),

generando una caja de $\sim 7.7 \times 7.7 \times 15.5$ nm. El sistema se hidró con 20,375 moléculas de agua TIP3P (13), y se neutralizó con NaCl 0.150 M.

Dado que la pose de unión de semaglutida proviene directamente de la estructura experimental, no se requirió procedimiento de docking. Para verificar que la preparación del sistema no alteró sustancialmente dicha pose, se calculó el RMSD del backbone de semaglutida (átomos N-C α -C-O, segmento PROA, 119 átomos) respecto a la estructura de referencia PDB 7KI0 en el primer frame de cada trayectoria de producción, mediante *gmx rms* con ajuste rot+trans. Los valores obtenidos (0.55-0.87 Å en todas las réplicas y condiciones de pH; Tabla 11 y Figuras A3-A4, Anexos 7-9) fueron inferiores al umbral de 1.5 Å empleado como criterio de conservación de pose en estudios de dinámica molecular de GPCRs(10), confirmando la preservación de la pose helicoidal experimental en los nueve sistemas simulados.

3.1.3. Implementación del pH

Antes de simular el complejo semaglutida-GLP-1R, fue necesario definir qué aminoácidos cambian su carga eléctrica en cada condición de pH, ya que este cambio de carga es el mecanismo por el cual el pH modifica las interacciones entre el fármaco y su receptor. Para ello se utilizó PropKa 3.0, un programa integrado en CHARMM-GUI que analiza la estructura tridimensional de cada aminoácido y predice a qué pH gana o pierde un protón (es decir, estima su pKa) (29). Esta asignación se realizó sobre la estructura cristalográfica preparada (PDB 7KI0, cadenas R y P) (12) antes de insertar el complejo en la membrana lipídica POPC, de modo que las cargas de cada aminoácido quedaron definidas en los archivos de topología (.top, .itp) y permanecieron fijas durante toda la simulación de producción (5,7).

El análisis identificó tres grupos de comportamiento. El primero y más relevante corresponde a siete histidinas del receptor GLP-1R (His99, His171, His173, His180, His212, His363 y His374), cuyos pKa estimados caen entre 5.0 y 7.4. Esto significa que a pH fisiológico (7.4) y alcalino (8.0) estas histidinas permanecen neutras (estado HSD, sin carga neta), pero al descender el pH a 5.0 endosomal captan un protón adicional y adquieren carga positiva (estado HSP, carga +1). Este cambio de carga es el evento molecular central del estudio, porque altera directamente las interacciones electrostáticas en la interfaz de unión. La elección del tautómero neutro específico, HSD (protonado en el nitrógeno N δ del anillo imidazólico) frente a HSE (protonado en N ϵ), fue determinada automáticamente por CHARMM-GUI según el patrón de puentes de hidrógeno de cada histidina en la estructura

crystallográfica, criterio estándar de este flujo de trabajo (28). En segundo lugar, los residuos ácidos (Asp, Glu) y básicos (Lys, Arg) del receptor presentaron pKa estimados por PropKa 3.0 muy por fuera del rango de pH estudiado: Asp y Glu con valores consistentemente inferiores a 5.0 (rango 0.44-4.55 para Asp; 3.12-6.25 para Glu) y Lys con pKa entre 5.75 y 10.22, y Arg entre 9.12 y 17.60. Todos los valores quedan fuera del intervalo de pH simulado (5.0-8.0) con excepción de Lys202 (pKa = 5.75), que al encontrarse enterrada mantiene su estado protonado por criterio de estabilidad estructural. Por consiguiente, todos permanecen en su estado de protonación estándar (Asp/Glu: desprotonados, carga -1; Lys/Arg: protonados, carga +1) en las tres condiciones simuladas. La lista completa de valores pKa por residuo estimados por PropKa 3.0 se incluye en el Anexo 11. En tercer lugar, los residuos ionizables de la propia semaglutida, incluyendo la histidina nativa en posición 7 del péptido (pKa < 5.0 en el contexto del complejo) y el ácido alfa-aminoisobutírico (AIB) en posición 8, que carece de grupo ionizable en el rango de pH estudiado (30), permanecieron también sin cambio de estado en ninguna condición.

Es importante señalar que este enfoque utiliza cargas fijas asignadas antes de la simulación (protonación constante fija), lo que significa que si un aminoácido cambia de entorno durante la trayectoria, su carga no se actualiza dinámicamente. Existe un método alternativo más sofisticado, la dinámica molecular a pH constante (CpHMD), que sí permite estos cambios en tiempo real, pero no fue implementado por limitaciones de compatibilidad con el campo de fuerzas CHARMM36m en sistemas con membrana lipídica explícita (31). Las implicancias de esta elección metodológica se discuten en la sección de Limitaciones.

3.1.4. Protocolo de simulación

Todos los sistemas moleculares fueron sometidos a un protocolo estándar de tres fases ejecutado con GROMACS 2025.3 (24) y el campo de fuerzas CHARMM36m (13), con aceleración GPU mediante CUDA 13.0 en la NVIDIA RTX 4090 del CBCRG-UCSM (Intel Core i9-14900K, 128 GB RAM DDR5). Las nueve trayectorias, 3 réplicas independientes por cada una de las 3 condiciones de pH, acumularon un total de 1,800 ns de simulación.

Fase 1. Minimización de energía

Cada sistema fue sometido a minimización mediante el algoritmo steepest descent (5,000 pasos) para eliminar contactos atómicos desfavorables presentes en la estructura ensamblada. El criterio de convergencia fue una fuerza máxima residual < 1,000 kJ·mol⁻¹·nm⁻¹.

Fase 2. Equilibración progresiva

La equilibración se ejecutó en seis etapas consecutivas (step6.1 a step6.6) siguiendo el protocolo estándar de CHARMM-GUI para sistemas GPCR-membrana (26). Las etapas 6.1-6.3 corresponden a NVT con restricciones de posición decrecientes sobre las cadenas pesadas de la proteína ($4,000 \rightarrow 1,000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$), utilizando el termostato v-rescale a 310.15 K (32). Las etapas 6.4-6.6 introducen el barostato C-rescale semi-isotrópico ($P = 1.0 \text{ bar}$, $\tau = 5.0 \text{ ps}$) y reducen las restricciones hasta cero, permitiendo que el sistema alcance las condiciones termodinámicas de producción. Los parámetros detallados de cada etapa se encuentran en los archivos step6.1-step6.6_equilibration.mdp disponibles en el repositorio (Anexo 5).

Fase 3. Simulación de producción

Cada réplica se extendió durante 200 ns sin restricciones de posición ($dt = 0.002 \text{ ps}$; 100,000,000 pasos). Los parámetros principales del archivo step7_production.mdp fueron:

- Condiciones periódicas de contorno (PBC): aplicadas en las tres dimensiones (xyz) para todos los grupos de átomos, eliminando los efectos de borde de la caja de simulación. La caja de simulación es de tipo ortorómbica con dimensiones aproximadas de $7.7 \times 7.7 \times 15.5 \text{ nm}$.
- Termostato: v-rescale (33), $T = 310.15 \text{ K}$, $\tau = 1.0 \text{ ps}$, aplicado por separado a tres grupos (proteína, membrana, solvente+iones).
- Barostato: C-rescale semi-isotrópico, $P = 1.0 \text{ bar}$, $\tau = 5.0 \text{ ps}$, compresibilidad $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$.
- Electrostática de largo alcance: Particle Mesh Ewald (PME)(34), $rcoulomb = 1.2 \text{ nm}$.
- Van der Waals: función switch entre 1.0 y 1.2 nm.
- Restricciones de enlace: algoritmo LINCS (32) aplicado a todos los enlaces H-átomo.
- Frecuencia de escritura: 1 frame cada 50 ps \rightarrow 4,000 frames por trayectoria (36,000 frames en el conjunto completo).

Los cálculos de energía libre se realizaron con gmx_MMPBSA v1.6.4 (25) sobre los frames 3,000-4,000 de cada trayectoria (150-200 ns), correspondientes a la ventana de equilibrio dinámico validada por la convergencia del RMSD.

3.1.5. Organización del Proceso

Una vez completadas las nueve trayectorias, el análisis se organizó en tres etapas secuenciales.

Etapas 1. Estabilidad conformacional

A partir de los archivos de trayectoria (.xtc) se calcularon cuatro métricas mediante las herramientas nativas de GROMACS (24):

- RMSD del backbone (gmx rms): desviación cuadrática media de las posiciones atómicas del backbone del receptor GLP-1R y de semaglutida respecto al frame inicial. La convergencia del RMSD, definida como variación < 0.05 nm entre bloques consecutivos de 50 ns, fue el criterio para validar la ventana de producción seleccionada para MM-GBSA.
- RMSF por residuo (gmx rmsf): fluctuación cuadrática media de cada residuo a lo largo de la trayectoria, calculada por separado para el receptor y para semaglutida.
- Radio de giro (gmx gyrate): distribución de masa respecto al centro geométrico del complejo. Su estabilidad confirma ausencia de desplegamiento conformacional global.

Puentes de hidrógeno interfaciales (gmx hbond): cuantificación del número de puentes de hidrógeno entre semaglutida y el GLP-1R por frame, con criterio geométrico estándar de distancia donador-aceptor ≤ 3.5 Å y ángulo $\leq 30^\circ$ (35).

Etapas 2. Energía libre de unión y descomposición por residuo

El cálculo de energía libre de unión se realizó con el método endpoint MM-GBSA mediante gmx_MMPBSA v1.6.4 (25) con los siguientes parámetros: modelo GB-OBC2 (igb = 5), concentración salina de 150 mM NaCl y descomposición energética pairwise por residuo (idecomp = 2), aplicado sobre los frames 3,000-4,000 de cada trayectoria (1,000 frames por réplica, 9,000 en el conjunto completo).

La descomposición pairwise genera las contribuciones individuales de van der Waals, electrostática, solvatación polar (GB) y no polar para cada residuo del receptor en las

tres condiciones de pH. Los hotspots farmacológicos se definieron como residuos con $\Delta G \leq -5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ en al menos una condición; la sensibilidad al pH se estableció mediante el criterio $|\Delta\Delta G| > 1.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ entre pH 5.0 y 7.4.

Etapa 3. Visualización e integración de resultados

Todas las métricas fueron procesadas y graficadas en R v4.3 con los paquetes ggplot2 (36), dplyr, tidyr y patchwork, aplicando un tema gráfico uniforme con paleta de colores fija por condición de pH. Las series temporales fueron suavizadas mediante media móvil de ventana $k = 100$ frames para facilitar la interpretación visual, sin alterar los valores estadísticos reportados en tablas, que corresponden a los datos crudos. La visualización molecular se realizó con ChimeraX 1.8 sobre frames representativos extraídos a $t = 175$ ns de la réplica 2.

3.2. Recursos

3.2.1. Humanos

Investigador: Vasquez Laime, Renato Junior

Asesora: Dra. Muñoz del Carpio Toia, Agueda

3.2.2. Institucionales

Computational Biology and Chemistry Research Group (CBCRG-UCSM).

Universidad Católica de Santa María.

3.2.3. Materiales

- Workstation CBCRG-UCSM (CPU i9-14900K, GPU RTX 4090, 128 GB RAM, Ubuntu Linux).
- Software de código abierto (GROMACS 2025.3, CHARMM-GUI, gmx_MMPBSA v1.6.4, R v4.3).
- Acceso a internet y repositorios estructurales (RCSB PDB).

3.2.4. Financieros

Autofinanciado.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. RESULTADOS

Los resultados se presentan en cuatro subsecciones ordenadas por peso interpretativo: la energía libre de unión como hallazgo central, seguida por la estabilidad conformacional como soporte estructural, los puentes de hidrógeno como indicador de las interacciones polares de la interfaz, y finalmente la descomposición energética por residuo para identificar hotspots pH-sensibles. Todos los análisis cuantitativos corresponden a la ventana 150-200 ns (frames 3,000-4,000) de $n = 3$ réplicas independientes por condición de pH (1,800 ns totales, 9 trayectorias).

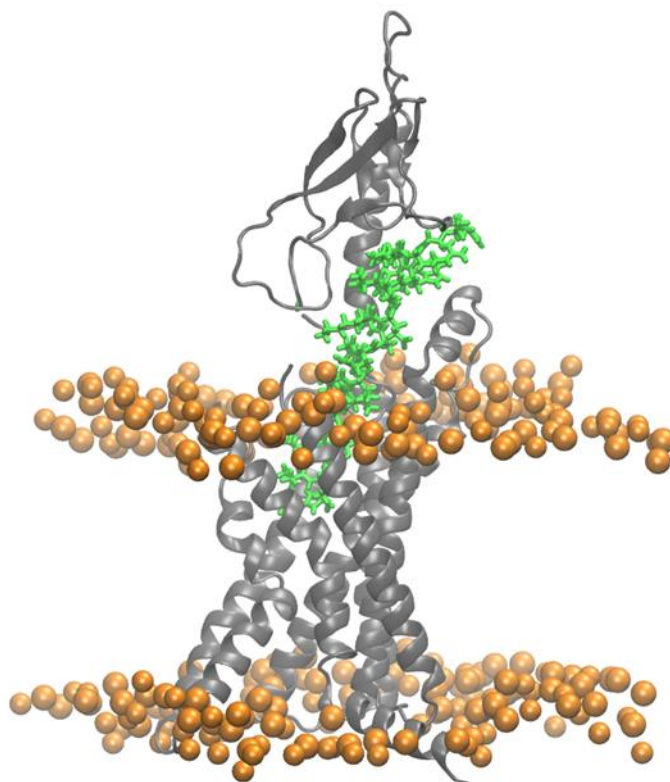


Figura 2. Sistema molecular simulado: complejo semaglutida-GLP-1R embebido en bicapa lipídica POPC (Réplica 2, pH 7.4, $t = 175$ ns). El receptor GLP-1R aparece en gris (representación ribbon); semaglutida en verde (sticks); las esferas naranjas corresponden a las cabezas polares de los lípidos POPC, que delimitan la bicapa. El receptor atraviesa la membrana con su dominio N-terminal orientado hacia el espacio extracelular y su región transmembrana anclada en la bicapa. La pose de unión de semaglutida se mantuvo estable a lo largo de toda la simulación.

Tabla 2. Parámetros del protocolo de simulación de dinámica molecular (GROMACS 2025.3)

Parámetro	Valor	Descripción
dt (paso integración)	0.002 ps (2 fs)	Integración numérica
nsteps (pasos totales)	100,000,000	200 ns de producción
Duración / réplica	200 ns	Por réplica
Frames totales	4,000 (1 frame/50 ps)	Resolución temporal 50 ps
Termostato	v-rescale	3 grupos independientes
Temperatura referencia	310.15 K (37 °C)	37 °C fisiológico
Barostato	C-rescale semi-isotrópico	Correcto para bicapa lipídica
Presión referencia	1.0 bar	Isobárico
Electrostática largo alcance	PME (Particle Mesh Ewald)	Alta precisión electrostática
Radio de corte (rcoulomb / rvdw)	1.2 nm	Estándar CHARMM36m
Campo de fuerzas	CHARMM36m	Optimizado proteína-membrana
Membrana (lípidos)	POPC (140 lípidos)	1-palmitoil-2-oleoil-PC
Agua / iones	TIP3P / NaCl 150 mM	Concentración fisiológica
Réplicas por pH	3 (independientes)	Semillas distintas
Total simulado	1800 ns (3 réplicas × 3 pH × 200 ns)	9 sistemas en total

Nota: Parámetros extraídos directamente de los archivos de configuración step7_production.mdp generados por CHARMM-GUI. Simulaciones ejecutadas en la workstation del CBCRG-UCSM (CPU Intel Core i9-14900K, GPU NVIDIA RTX 4090 24 GB, Arequipa, Perú).

1.1. Energía Libre de Unión MM-GBSA

Es importante señalar que el método MM-GBSA, al omitir la contribución entrópica conformacional y emplear un modelo implícito de solvatación, no genera valores absolutos equivalentes a constantes de disociación (K_d) experimentales (24). Por esta razón, los resultados de energía libre que se presentan a continuación tienen valor comparativo entre las tres condiciones de pH evaluadas bajo idéntico protocolo, y no deben leerse como estimaciones absolutas de afinidad termodinámica.

Antes de proceder con el cálculo de energía libre, se verificó que la pose de unión de semaglutida no se hubiera desplazado durante la preparación del sistema. El RMSD del backbone respecto a la estructura cristalográfica de origen (PDB 7KI0) al inicio de cada trayectoria de producción fue de 0.57 ± 0.02 Å (pH 5.0), 0.82 ± 0.06 Å (pH 7.4) y 0.73 ± 0.09 Å (pH 8.0), todos por debajo del umbral de conservación de pose de 1.5 Å establecido para simulaciones de GPCRs (10) (Tabla 11 y Figuras A3-A4, Anexos 7-9). Esto confirma que la posición helicoidal experimental del péptido se preservó en los nueve sistemas y constituye un punto de partida válido para los análisis subsecuentes.

Con esta validación, la Tabla 3 y la Figura 3 muestran que semaglutida mantiene una energía libre de unión fuertemente negativa en las tres condiciones de pH. La afinidad más favorable se registró a pH 8.0 (-151.35 ± 27.18 kcal·mol⁻¹), seguida por pH 7.4 (-131.26 ± 42.70 kcal·mol⁻¹) y pH 5.0 (-105.60 ± 33.41 kcal·mol⁻¹). La diferencia de aproximadamente 26 kcal·mol⁻¹ entre pH 7.4 y pH 5.0 representa una reducción del 19% en la magnitud de la afinidad al pasar del medio plasmático al entorno endosomal ácido. No obstante, incluso a pH 5.0, el valor de ΔG permanece marcadamente negativo, lo que indica que el complejo se mantiene termodinámicamente estable sin que se observe disociación espontánea dentro de los 200 ns simulados.

Tabla 3. Energía libre de unión MM-GBSA del complejo semaglutida-GLP-1R por condición de pH

Condición fisiológica	pH	ΔG binding (kcal·mol ⁻¹)	DE	SEM	Puentes H (media \pm DE)
Endosomal tardío	5.0	-105.60	33.41	19.29	9.7 \pm 3.0
Sistémico / plasmático	7.4	-131.26	42.70	24.65	15.2 \pm 5.5
Gástrico / SNAC	8.0	-151.35	27.18	15.70	18.1 \pm 4.4

Valores más negativos de ΔG binding indican mayor afinidad de unión. DE = desviación estándar; SEM = error estándar de la media; n = 3 réplicas independientes por condición. El cálculo se realizó sobre los últimos 50 ns de cada trayectoria (ventana 150-200 ns) con el modelo de solvatación GB-OBC2 y NaCl 150 mM. El ANOVA de una vía no alcanzó significación estadística [$F(2,6) = 1.286$; $p = 0.343$], resultado atribuible a la baja potencia inherente a n = 3 réplicas en presencia de alta variabilidad interna; sin embargo, el tamaño del efecto fue grande ($\eta^2 = 0.300$), indicando que el 30% de la varianza del ΔG es explicada por la condición de pH (ver Tablas 4, 8 y 9). Dado que MM-GBSA omite la contribución entrópica

conformacional, estos valores no equivalen a K_d experimentales y deben interpretarse de forma comparativa entre condiciones sometidas al mismo protocolo.

Alta afinidad residual a pH endosomal

El complejo semaglutida-GLP-1R se mantiene estable incluso en el endosoma ácido
Valores más negativos = unión más favorable | media \pm DE, n = 3 réplicas

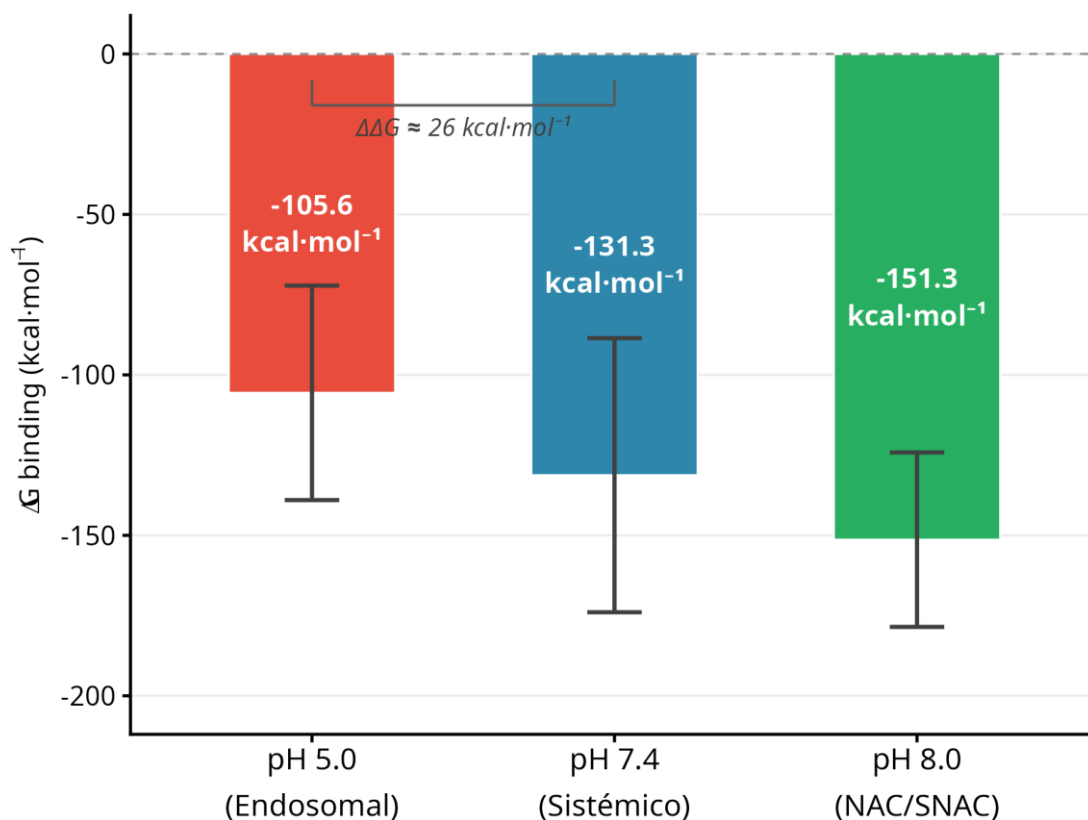


Figura 3. Energía libre de unión MM-GBSA del complejo semaglutida-GLP-1R por condición de pH (media \pm DE, n = 3 réplicas). Valores más negativos indican mayor afinidad de unión. La diferencia entre pH 7.4 y pH 5.0 ($\Delta\Delta G \approx 26$ kcal·mol⁻¹, ~19%) es cuantitativamente relevante pero insuficiente para producir disociación espontánea del complejo en las trayectorias analizadas. Las barras de error representan ± 1 DE.

La descomposición de la energía libre de unión en sus componentes revela que las interacciones de van der Waals (VdW) constituyen el contribuyente dominante en las tres condiciones. A pH 5.0, el componente electrostático se vuelve menos favorable como consecuencia de las cargas positivas introducidas por la protonación de las histidinas. En contraste, las contribuciones VdW de los residuos hidrofóbicos, MET204, LEU183, MET233, LEU244, permanecen prácticamente invariantes entre condiciones, explicando por qué la reducción global del ΔG a pH ácido no conduce a la disociación del complejo.

1.1.1. Análisis ANOVA, media y Tukey HSD

La comparación entre condiciones de pH mediante ANOVA de una vía no alcanzó significación estadística [$F(2,6) = 1.286$; $p = 0.343$] (Tabla 4), lo que se atribuye a la baja potencia estadística inherente al diseño de $n = 3$ réplicas por condición en presencia de alta variabilidad interna ($DE = 27-43 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $CV = 18-33\%$), variabilidad que fue homogénea entre los tres grupos (test de Bartlett: $\chi^2 = 0.333$, $p = 0.847$). No obstante, el tamaño del efecto fue grande ($\eta^2 = 0.300$), indicando que el 30% de la varianza total del ΔG es atribuible a la condición de pH, lo cual es consistente con la relevancia biológica de las diferencias observadas (Tabla 4, 8 y 9). Las comparaciones entre grupos se interpretan por tanto de forma descriptiva, conforme a la práctica habitual en estudios de dinámica molecular con réplicas limitadas.

Tabla 4. ANOVA de una vía, ΔG binding ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) por condición de pH

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p	η^2
pH (entre grupos)	3154.63	2	1577.32	1.286	0.343	0.300
Residuos (dentro)	7356.46	6	1226.08	-	-	-
Total	10511.09	8	-	-	-	-

SC = suma de cuadrados · gl = grados de libertad · CM = cuadrado medio · η^2 = proporción de la varianza total explicada por el pH (tamaño del efecto). $F(2,6) = 1.286$, $p = 0.343$, no significativo, atribuido a baja potencia estadística con $n = 3$. $\eta^2 = 0.300$ indica que el pH explica el 30% de la varianza del ΔG (efecto grande según Cohen 1988).

1.2. Estabilidad Conformacional: RMSD, RMSF y Radio de Giro

Los tres sistemas alcanzaron convergencia del RMSD del backbone del receptor GLP-1R antes de los 100 ns en todas las réplicas, validando los frames 150-200 ns seleccionados para el cálculo de MM-GBSA. La condición de pH 5.0 presentó la mayor desviación media respecto al frame inicial, mientras que pH 7.4 y pH 8.0 mantuvieron trayectorias más próximas entre sí. El RMSD de semaglutida respecto al receptor fue bajo y estable ($< 0.3 \text{ nm}$) en las tres condiciones, indicando que la pose de unión helicoidal del péptido se conserva durante toda la simulación independientemente del pH.

Convergencia estructural del complejo semaglutida-GLP-1R

Línea suavizada (ventana 4 ns) | Banda = \pm SEM (n = 3 réplicas) | Zona gris = MM-GBSA (150–200 ns)

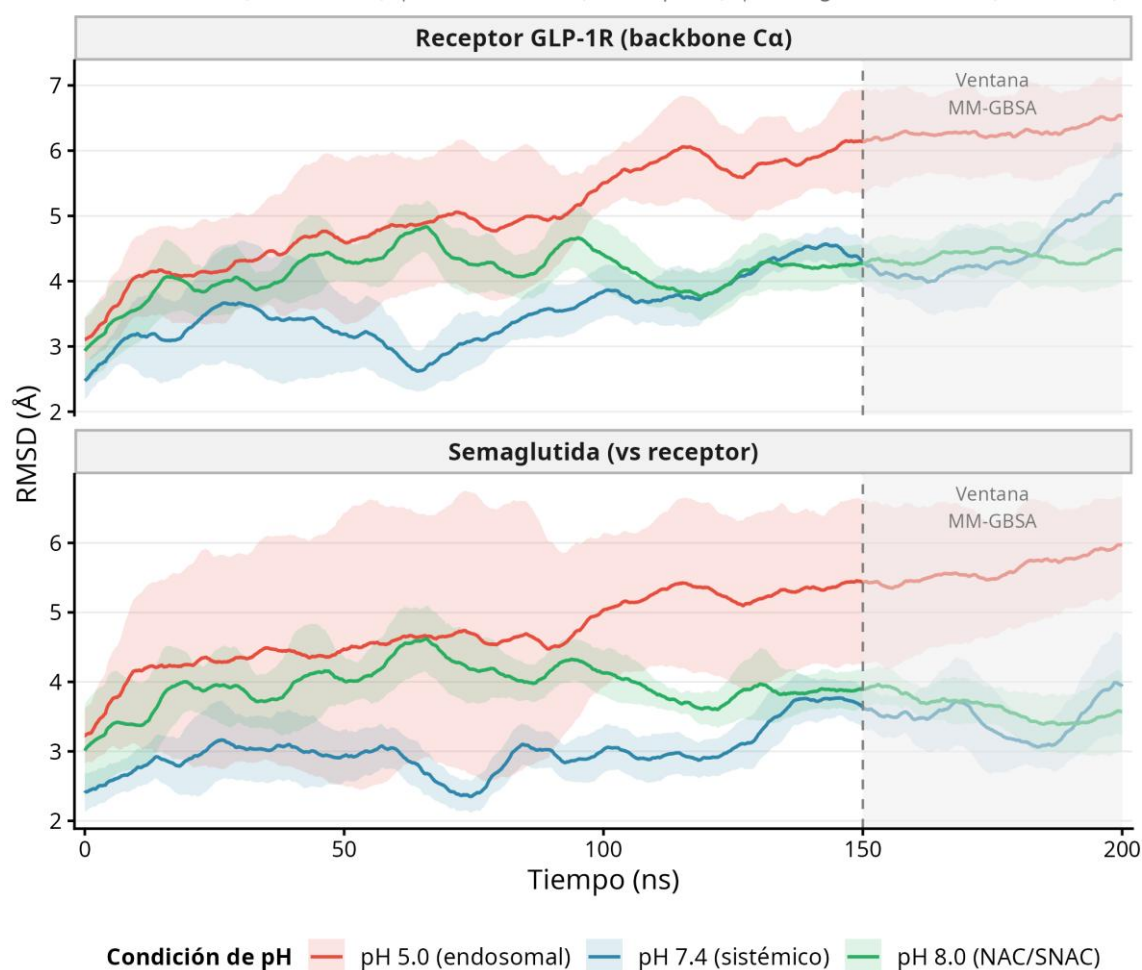


Figura 4. Estabilidad estructural del complejo semaglutida-GLP-1R a lo largo de 200 ns de simulación. Panel superior: RMSD del esqueleto proteico (backbone C α) del receptor GLP-1R. Panel inferior: RMSD de semaglutina respecto al receptor. Cada línea es la media suavizada (ventana 4 ns) de n = 3 réplicas; la banda sombreada representa \pm SEM. La línea punteada vertical marca el inicio de la ventana de análisis MM-GBSA (150-200 ns). Las condiciones pH 7.4 y pH 8.0 alcanzan un plateau antes de los 150 ns; pH 5.0 muestra una deriva más pronunciada pero se estabiliza dentro de la ventana de análisis seleccionada.

El análisis de RMSF por residuo (Figura A1, Anexo) confirmó que los loops extracelulares del GLP-1R son las regiones de mayor flexibilidad en las tres condiciones, mientras que el núcleo de hélices transmembrana permanece rígido. En semaglutina, los extremos N- y C-terminal fluctúan más que el segmento helicoidal central, que es la región en contacto directo con la interfaz de unión del receptor. El radio de giro no evidenció cambios globales marcados

entre condiciones, lo que sugiere ausencia de reordenamientos conformacionales mayores durante la fase de producción.

1.3. Puentes de Hidrógeno en la Interfaz Semaglutida-GLP-1R

La cuantificación de puentes de hidrógeno en la interfaz receptor-ligando reveló diferencias cuantitativas claras entre condiciones. El mayor número de puentes de hidrógeno se registró a pH 8.0 (18.1 ± 4.4), seguido de pH 7.4 (15.2 ± 5.5) y pH 5.0 (9.7 ± 3.0). Esta reducción del 36% a pH 5.0 coincide con el cambio de estado de protonación de siete histidinas del GLP-1R: al adquirir carga positiva (estado HSP), pierden capacidad como aceptores de puentes de hidrógeno hacia los grupos donantes de semaglutida. La Tabla 5 detalla el estado de protonación de cada histidina por condición de pH, y la Figura 6 ilustra su distribución espacial.

Interacciones receptor-ligando durante la simulación

La protonación de 7 histidinas a pH 5.0 reduce los puentes de H en la interfaz (etiquetas = promedio \pm DE en ventana 150-200 ns | zona gris = análisis MM-GBSA)

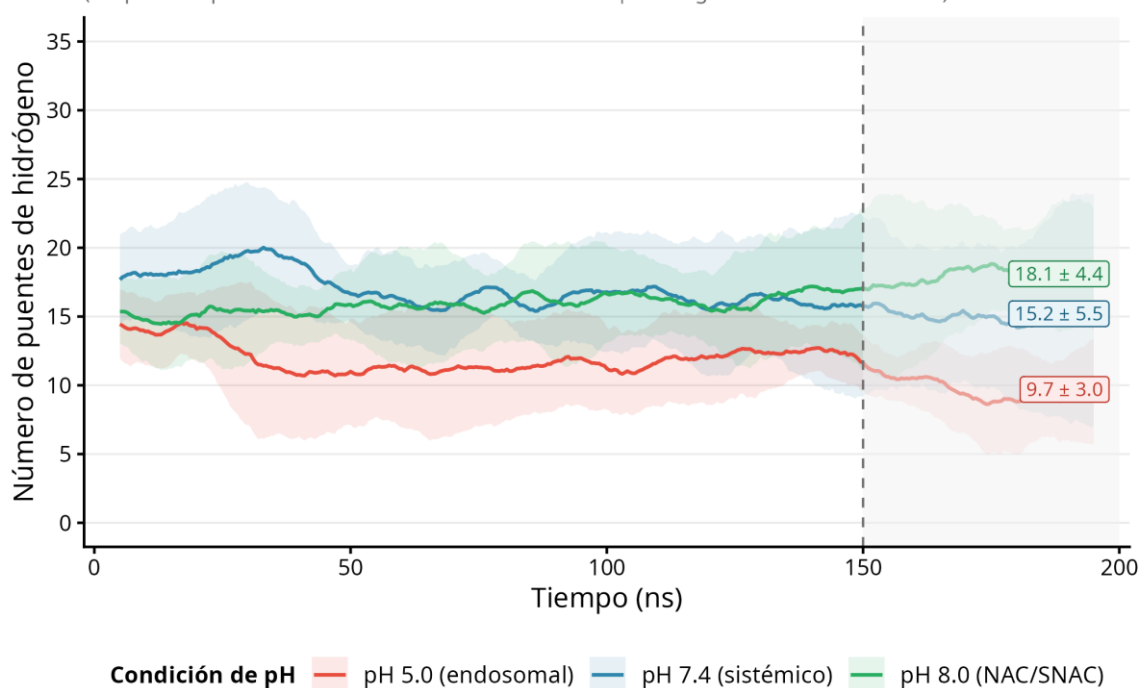


Figura 5. Número de puentes de hidrógeno en la interfaz semaglutida-GLP-1R a lo largo de 200 ns de simulación. Las etiquetas al final de cada curva indican el promedio \pm DE en la ventana 150-200 ns. A pH 5.0, el número de puentes cae un 36% respecto a pH 7.4 (9.7 ± 3.0 vs. 15.2 ± 5.5), lo que coincide con la protonación de las siete histidinas del GLP-1R a pH ácido: al adquirir carga positiva, pierden capacidad de actuar como aceptores de puentes de

hidrógeno (ver Tabla 5 y Figura 6). La banda sombreada representa \pm DE; la línea punteada marca el inicio de la ventana de análisis MM-GBSA.

Tabla 5. Estado de protonación de las histidinas pH-sensibles del GLP-1R (PropKa 3.0)

Residuo	Localización	pH 5.0	pH 7.4	pH 8.0	pKa
His99	N-terminal extracelular	HSP (+1)	HSD (neutro)	HSD (neutro)	6.16
His171	N-terminal extracelular	HSP (+1)	HSD (neutro)	HSD (neutro)	7.08
His173	N-terminal extracelular	HSP (+1)	HSD (neutro)	HSD (neutro)	5.97
His180	ECL1 - contacto ligando	HSP (+1)	HSD (neutro)	HSD (neutro)	6.35
His212	ECL2	HSP (+1)	HSD (neutro)	HSD (neutro)	6.37
His363	TM6 (transmembrana)	HSP (+1)	HSD (neutro)	HSD (neutro)	7.95
His374	TM6 / TM7	HSP (+1)	HSD (neutro)	HSD (neutro)	6.35

HSP = histidina protonada (carga +1, estado ácido). HSD = histidina neutra (estado fisiológico). Todas las histidinas listadas cambian de estado únicamente a pH 5.0. ECL = loop extracelular; TM = hélice transmembrana. His180 destaca por su ubicación en ECL1, en contacto directo con semaglutida.

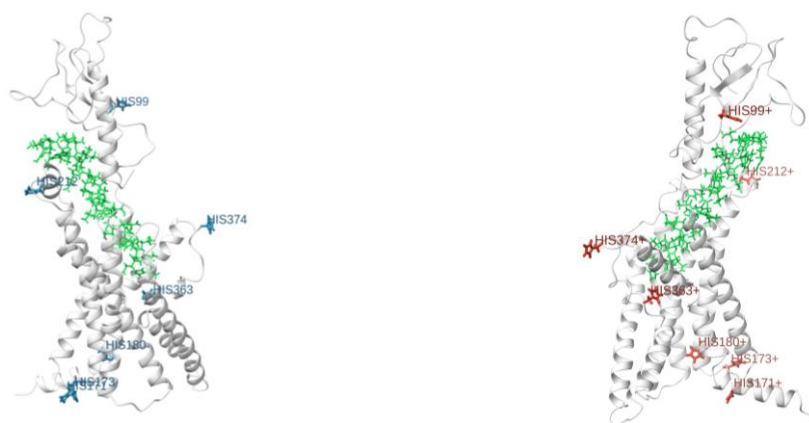


Figura 6. Estado de protonación de las histidinas del GLP-1R a pH 7.4 (izquierda) vs. pH 5.0 (derecha). A pH 7.4 las histidinas permanecen neutras (HSD, sticks azules); a pH 5.0 adquieren carga positiva (HSP, sticks rojos). Semaglutida se muestra en verde en ambos paneles. Las siete histidinas se distribuyen desde el dominio N-terminal extracelular (His99, His171, His173) hasta las hélices transmembrana profundas (His363, His374), con His180 en ECL1 en contacto directo con el ligando. Réplica 2, $t = 175$ ns. Visualización: ChimeraX 1.8.

1.4. Identificación de Hotspots Farmacológicos pH-Sensibles

La descomposición energética pairwise (idecomp=2) identificó 22 residuos con $\Delta G \leq -5.0$ kcal·mol⁻¹ en al menos una condición de pH (hotspots). De estos, 11 exhibieron pH-sensibilidad ($|\Delta\Delta G| > 1.0$ kcal·mol⁻¹ entre pH 5.0 y 7.4). La comparación con residuos de contacto validados experimentalmente por Wootten et al. 2016 (37) y Zhang et al. 2021 (12) demostró coincidencia en 17 de los 22 hotspots, validando la metodología. GLU387 presentó la mayor contribución total pairwise diferencial ($\Delta G_{total} = -20.96 / -51.94 / -53.98$ kcal·mol⁻¹ para pH 5.0, 7.4 y 8.0, respectivamente; su componente VdW aislado = $-3.9 / -3.2 / -2.2$ kcal·mol⁻¹, ver Figura 7); HIS180 y HIS363 reducen su contribución VdW al protonarse (HSP) a pH 5.0.

Tabla 6. Hotspots farmacológicos del GLP-1R, ΔG pairwise por residuo ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Residuo	Localización	ΔG pH 5.0	ΔG pH 7.4	ΔG pH 8.0	pH-sensible
GLU387†	TM6 (profundo)	-20.96	-51.94	-53.98	Sí
HIS180*	ECL1 - contacto lig.	-5.27	-6.04	-6.30	Sí
HIS363*	TM6	-4.08	-6.06	-5.93	Sí
LEU359*	TM5-TM6	-4.19	-5.22	-5.30	Sí
MET204	ECL1-TM2	-6.76	-6.67	-7.08	No
MET233	TM3	-6.05	-6.18	-6.80	No
LEU244	TM3	-5.74	-6.11	-6.11	No
LEU183	TM2	-5.87	-5.98	-6.00	No
LEU166	TM2	-5.68	-5.89	-6.21	No

Hotspot: residuo con $\Delta G \leq -5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ en al menos una condición de pH. pH-sensible (*):

la contribución varía $>1.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ entre pH 5.0 y 7.4, lo que lo convierte en diana candidata para el diseño de análogos.

† GLU387: los valores reportados son ΔG total (VdW + electrostática + solvatación); su componente VdW aislado es $-3.85/-3.16/-2.19 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (ver Figura 7). HIS180 y HIS363 a pH 5.0: al protonarse (HSP, carga +1), su contribución VdW disminuye por efecto electrostático desfavorable.

Filas grises = residuos pH-sensibles. $n = 9$ trayectorias (3 réplicas \times 3 condiciones de pH).

Residuos clave del sitio de unión semaglutida-GLP-1R

Contribución de van der Waals por residuo | Borde rojo = pH-sensible

GLU387: VdW mostrado; $\Delta G_{total} = -20.96/-51.94/-53.98 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ | HIS180/HIS363: protonadas (HSP) a pH 5.0

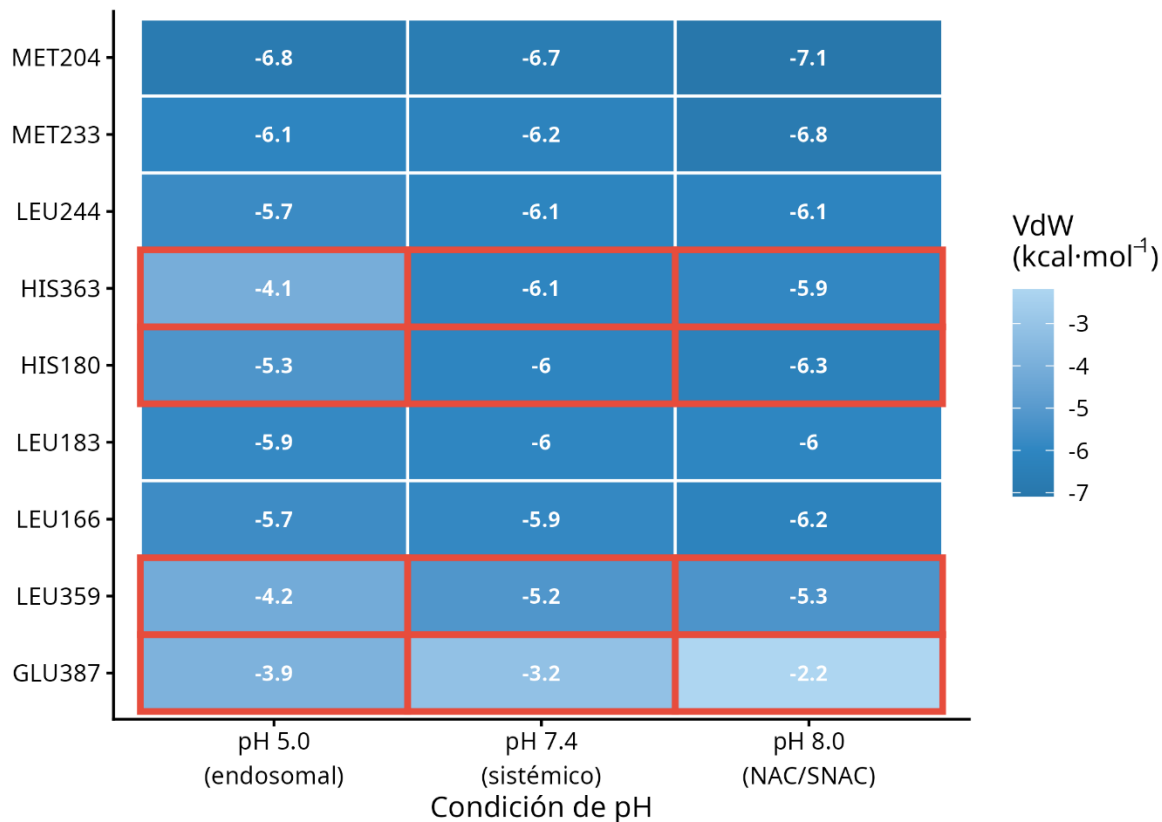


Figura 7. Contribución de van der Waals por residuo del GLP-1R en las tres condiciones de pH. Cada celda indica cuánto contribuye ese residuo a la afinidad de unión (valores más negativos = mayor contribución). El recuadro rojo destaca los residuos sensibles al pH.

GLU387 es un caso especial: su VdW aislado es bajo, pero su contribución total cae 31 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ al bajar a pH ácido porque pierde sus interacciones electrostáticas al protonarse los residuos vecinos (His363, His374). Los residuos azules (MET204, LEU244, LEU183) forman el núcleo hidrofóbico de anclaje, prácticamente invariante entre condiciones, lo que explica por qué el complejo no se disocia en el endosoma. Los residuos Arg fueron excluidos por sobreestimación conocida del modelo MM-GBSA.



Figura 8. Residuos clave de la interfaz semaglutida-GLP-1R. Izquierda: GLU387 (rojo) en la hélice transmembrana TM6, en contacto con el segmento inferior de semaglutida (verde). Su contribución energética cae de -51.94 a -20.96 kcal·mol⁻¹ al bajar el pH ($|\Delta\Delta G| = 31.0$ kcal·mol⁻¹), por efecto de la protonación de His363 y His374 adyacentes. Derecha: residuos hidrofóbicos MET204, LEU244, LEU183, MET233 y LEU166 (azul) forman el núcleo alifático de anclaje, con interacciones prácticamente invariantes entre pH 5.0 y 8.0, responsables de la afinidad residual de -105.60 kcal·mol⁻¹ a pH endosomal. Réplica 2, pH 7.4, $t = 175$ ns. ChimeraX 1.8.



Figura 9. Estructura tridimensional de semaglutida al término de la simulación de producción (VDW spheres). El segmento helicoidal central (residuos 7-26, verde) conserva su organización α -helicoidal en las tres condiciones de pH, concordante con los valores de RMSD de la Figura 4. El punto amarillo señala Lys26, sitio de conjugación de la cadena C18 (no modelada; ver Limitaciones). Los extremos N- y C-terminal exhiben mayor movilidad (Figura A1). Réplica 2, pH 7.4, $t = 175$ ns. ChimeraX 1.8.

2. DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó computacionalmente el efecto de tres condiciones de pH biológicamente relevantes sobre el complejo semaglutida-GLP-1R mediante simulaciones de dinámica molecular de 200 ns en membrana lipídica POPC explícita (Figura 2). Los resultados cuantitativos, diferencias en energía libre de unión, puentes de hidrógeno y contribuciones energéticas por residuo (Tablas 3-6, Figuras 3-9), permiten construir una hipótesis mecánica integrada sobre la plausibilidad molecular de la intolerancia gastrointestinal a semaglutida. Estos resultados deben interpretarse de manera comparativa entre condiciones sometidas al mismo protocolo, más que como valores absolutos equivalentes a afinidades experimentales.

2.1. Alta afinidad residual a pH endosomal: el hallazgo central

El hallazgo central es que semaglutida mantiene $\Delta G = -105.60 \pm 33.41 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ a pH 5.0 endosomal, solo $\sim 26 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ menos negativo que a pH 7.4, y muy por debajo del umbral positivo que indicaría disociación espontánea. Este resultado es consecuencia del balance entre dos efectos opuestos: la reducción del componente electrostático por la protonación de las siete histidinas (Figura 6; Tabla 5), compensada por la estabilidad de las interacciones hidrofóbicas de van der Waals con MET204, LEU183, MET233 y LEU244, visibles estructuralmente en la Figura 8 (panel derecho), que permanecen casi invariantes entre los tres pH (Tabla 6). GLU387, cuya posición estratégica se observa en la Figura 8 (panel izquierdo), pierde $\sim 31 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ de contribución al bajar el pH endosomal, pero esta pérdida no es suficiente para desestabilizar el complejo dado el anclaje hidrofóbico conservado. Este balance es consistente con los datos experimentales de Manchanda et al. 2023 (6) y Fang et al. 2020 (5).

2.2. El área postrema y el NTS: mecanismo neurológico de las náuseas

La relevancia clínica de la retención endosomal se comprende a través del papel del área postrema (AP) y el Núcleo del Tracto Solitario (NTS). El AP, desprovisto de barrera hematoencefálica, con alta densidad de GLP-1R, es directamente accesible a semaglutida circulante (22). La conservación de afinidad a pH endosomal observada en este estudio es compatible con la posibilidad de que, una vez internalizado el complejo, parte de la señalización persista más tiempo del que permitiría un ligando de menor afinidad residual. (Figura 10).

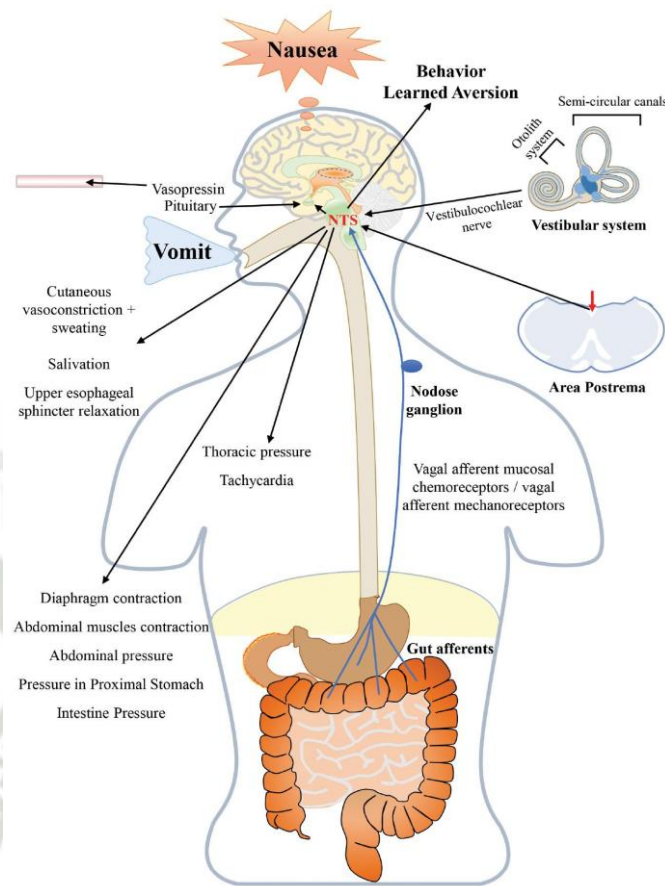


Figura 10: Mecanismo neurológico del vómito mediado por el área postrema y el núcleo del tracto solitario (NTS). La activación del GLP-1R en el área postrema activa el NTS, que coordina la respuesta emética. En el contexto de este estudio, la afinidad residual del complejo a pH 5.0 endosomal es termodinámicamente compatible con una señalización más prolongada que la de ligandos de menor afinidad, aunque la confirmación experimental directa de este vínculo queda pendiente. Adaptado de Xu et al. (38)

Una secuencia mecánica compatible con estos resultados sería la siguiente: a pH 7.4, semaglutida activa el GLP-1R del AP generando señalización por Gs y efectos terapéuticos; tras la internalización, el descenso del pH debilita la interfaz polar pero la afinidad residual podría retrasar la disociación del complejo; esta persistencia relativa favorecería una señal intracelular más prolongada, con posible activación preferencial de vías de β -arrestina ("bias signaling") que convergen en el NTS. Sin embargo, este trabajo no demuestra de manera directa internalización en células vivas, señalización diferencial por β -arrestina ni activación funcional del NTS. El vínculo con náuseas y vómitos debe entenderse como una hipótesis mecánica plausible, no como una demostración experimental (22,39).

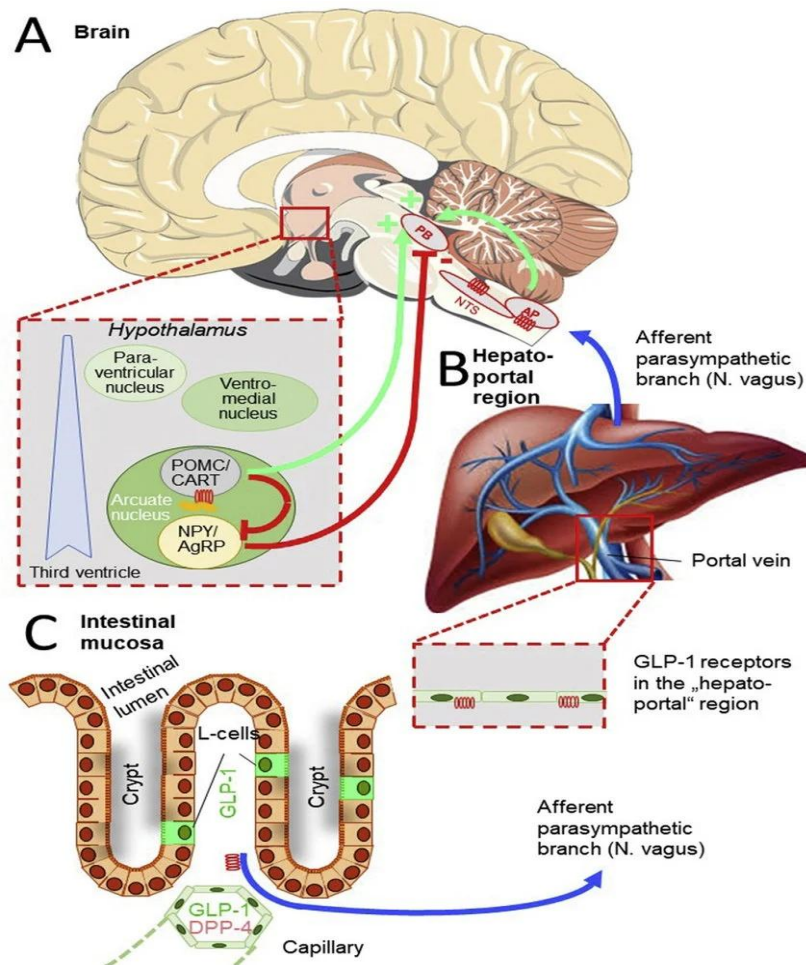


Figura 11: Acceso de semaglutida al área postrema por vía sistémica. A diferencia de la mayoría de estructuras del SNC, el área postrema carece de barrera hematoencefálica efectiva, lo que permite el acceso directo de semaglutida circulante a sus neuronas. La afinidad residual del complejo a pH endosomal observada en este estudio es compatible con una señalización más persistente que la de agonistas de vida media corta, aunque esta relación requiere validación experimental. Adaptado de Xu et al (38).

2.3. Implicancias clínicas y traslacionales

Estos hallazgos son compatibles con una explicación molecular para la mayor frecuencia de intolerancia gastrointestinal reportada con semaglutida versus agonistas de vida media corta (exenatida, liraglutida), aunque esta interpretación trasciende el alcance directo del modelo computacional y requiere soporte experimental; la menor afinidad residual de estos agonistas facilita la disociación y el reciclaje endosomal del receptor (14). Esta interpretación es también compatible con el mayor riesgo durante la escalada de dosis, cuando la densidad de receptores internalizados en el AP podría ser máxima.

Los 11 hotspots pH-sensibles, encabezados por GLU387, HIS180, HIS363 y LEU359 (Tabla 6, Figuras 7-8), constituyen las primeras dianas moleculares concretas para el diseño racional de análogos con afinidad pH-dependiente reducida: moléculas que mantengan eficacia terapéutica a pH 7.4 pero permitan la disociación del complejo a pH 5.0 endosomal, facilitando el reciclaje del receptor y potencialmente mejorando la tolerabilidad gastrointestinal. La condición pH 8.0 (SNAC) se interpreta como hallazgo exploratorio; sus implicancias clínicas directas requieren validación experimental específica antes de extraer conclusiones sobre la formulación oral.

2.4.Experimentos mínimos de validación

Los hallazgos computacionales del presente estudio generan predicciones específicas que pueden ser verificadas experimentalmente mediante al menos tres aproximaciones complementarias.

En primer lugar, la sensibilidad al pH de los hotspots His180, His363 y GLU387 puede evaluarse mediante mutagénesis dirigida (alanine scanning) en células HEK293 que expresen establemente el GLP-1R humano. Las líneas mutantes y el tipo silvestre serían sometidas a ensayos de acumulación de cAMP (señalización Gs) y reclutamiento de β -arrestina-2 mediante BRET, comparando las respuestas a semaglutida en medio a pH 7.4 versus medio acidificado a pH 5.0. Este diseño permitiría determinar si la eliminación de la sensibilidad al pH en los residuos identificados reduce la señalización endosomal diferencial, siguiendo la metodología validada por Jones et al. (2018) y Pickford et al. (2023) para agonistas biased del GLP-1R (40,41).

En segundo lugar, la predicción de retención endosomal prolongada puede verificarse mediante ensayos de internalización y reciclaje del receptor. Utilizando semaglutida conjugada a un fluoróforo (por ejemplo, TMR o VivoTag) y microscopía confocal en tiempo real, se compararía la cinética de retorno del receptor a la membrana plasmática entre el tipo silvestre y los mutantes His180A, His363A y GLU387A. Complementariamente, citometría de flujo con marcaje de superficie (SNAP-tag o anticuerpo anti-GLP-1R) permitiría cuantificar la densidad de receptores en membrana tras exposición a semaglutida a distintos tiempos, como han demostrado Fang et al. (2020) y Bitsi et al. (2023) (5,42).

En tercer lugar, para confirmar si la retención endosomal predicha por las simulaciones se traduce en mayor derivación del receptor hacia degradación lisosomal, se cuantificaría la abundancia de GLP-1R mediante western blot tras incubación prolongada con semaglutida, en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas lisosomales (bafilomicina A1 o

cloroquina). La desaparición de la banda del receptor de longitud completa indicaría degradación, mientras que su rescate con inhibidores confirmaría la vía lisosomal, protocolo aplicado exitosamente por Jones et al. (2018) para distintos agonistas del GLP-1R (40).

2.5.Limitaciones del estudio

Los resultados son computacionales e implican limitaciones inherentes

- el pH se implementó mediante estados de protonación fijos (PropKa 3.0) en lugar de dinámica de protones constante (CpHMD).
- MM-GBSA subestima la contribución entrópica al ΔG total, afectando valores absolutos sin invalidar comparaciones relativas entre condiciones con idéntico protocolo.
- Las simulaciones de 200 ns no capturan transiciones conformacionales de escala de microsegundos ni eventos de disociación espontánea. Estas limitaciones son comunes a la literatura de dinámica molecular de GPCRs y no invalidan las conclusiones comparativas entre las tres condiciones evaluadas.
- La cadena grasa C18 de semaglutida no fue incluida en el modelo computacional dado que no está resuelta en la estructura experimental PDB 7KI0 y no participa directamente en la interfaz de unión con el GLP-1R; su función es farmacocinética (unión a albúmina, extensión de vida media) y su omisión no afecta los resultados de energía libre de unión ni la identificación de hotspots en el sitio de unión.

Las desviaciones estándar de la energía libre de unión ($DE = 27-43 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$; coeficiente de variación $\approx 18-33\%$) reflejan la variabilidad interréplica inherente al método MM-GBSA con $n = 3$, comportamiento documentado en la literatura para simulaciones de GPCRs en membrana explícita. El test de Bartlett confirmó homogeneidad de varianzas entre las tres condiciones de pH ($\chi^2 = 0.333$, $p = 0.847$), descartando que la dispersión sea atribuible a una condición específica. El tamaño del efecto grande ($\eta^2 = 0.300$) es consistente con la relevancia biológica de las diferencias observadas, aun cuando la potencia estadística con $n = 3$ no permita alcanzar significación formal.

CONCLUSIONES

1. Se construyeron y equilibraron exitosamente nueve sistemas moleculares del complejo semaglutida-GLP-1R en membrana lipídica POPC explícita bajo condiciones de pH 5.0, 7.4 y 8.0. Mediante PropKa 3.0 se identificó que siete histidinas del GLP-1R cambian de estado neutro a protonado exclusivamente a pH endosomal (5.0).
2. El análisis de RMSD y RMSF demostró que el complejo semaglutida-GLP-1R alcanzó convergencia estructural antes de los 100 ns en las tres condiciones de pH. La condición de pH 5.0 presentó mayor desviación media del receptor respecto al frame inicial; la pose global de unión del péptido y el radio de giro del sistema se conservaron en las tres condiciones.
3. La cuantificación de puentes de hidrógeno en la interfaz semaglutida-GLP-1R mostró valores de 18.1 ± 4.4 (pH 8.0), 15.2 ± 5.5 (pH 7.4) y 9.7 ± 3.0 (pH 5.0). La reducción del 36% a pH endosomal coincide con la protonación simultánea de las siete histidinas del receptor.
4. El cálculo de energía libre de unión MM-GBSA mostró que semaglutida mantiene una afinidad comparativamente negativa por GLP-1R en las tres condiciones de pH evaluadas, con valores de ΔG de -105.60, -131.26 y -151.35 kcal·mol⁻¹ para pH 5.0, 7.4 y 8.0, respectivamente. Estos valores, interpretados de forma comparativa entre condiciones con idéntico protocolo (no como equivalentes a K_d experimental), evidencian un gradiente de afinidad pH-dependiente. La descomposición por residuo identificó 22 hotspots farmacológicos ($\Delta G \leq -5.0$ kcal·mol⁻¹), de los cuales 11 son pH-dependientes ($|\Delta\Delta G| > 1.0$ kcal·mol⁻¹ entre pH 5.0 y 7.4). El análisis estadístico formal (ANOVA de una vía) no alcanzó significación [$F(2,6) = 1.286$; $p = 0.343$] debido a la baja potencia estadística con $n = 3$ réplicas, aunque el tamaño del efecto fue grande ($\eta^2 = 0.300$).
5. Los resultados computacionales obtenidos son compatibles con la hipótesis de que la alta afinidad residual del complejo semaglutida-GLP-1R a pH endosomal (5.0) podría dificultar la disociación del ligando y favorecer la persistencia de señalización postendocítica. El estudio aporta una base molecular plausible para comprender la intolerancia gastrointestinal asociada a semaglutida, aunque la demostración directa de este mecanismo requiere validación experimental adicional mediante estudios de internalización, reciclaje y señalización diferencial en modelos celulares.

RECOMENDACIONES

1. Ampliar el estudio mediante simulaciones a pH 6.0 y 6.5 para trazar una curva dosis-respuesta del efecto del pH sobre la afinidad del complejo e identificar el punto crítico a partir del cual la disociación del ligando comienza a ser termodinámicamente favorable.
2. Validar experimentalmente los hotspots pH-sensibles identificados, especialmente GLU387, His180 y His363, mediante mutagénesis dirigida en células HEK293 que expresen el GLP-1R, midiendo activación de Gs y tasa de internalización del receptor a distintos pH.
3. Utilizar los hotspots pH-dependientes como punto de partida para el diseño computacional de análogos de semaglutida con menor afinidad a pH endosomal (5.0) y afinidad preservada a pH sistémico (7.4), con el objetivo de mejorar la tolerabilidad gastrointestinal sin comprometer la eficacia terapéutica.
4. Incorporar en estudios futuros el análisis de señalización diferencial del GLP-1R a distintos pH, evaluando cambios conformacionales en el dominio intracelular asociados a la activación preferencial de proteína Gs versus β -arrestina.
5. A la Facultad de Medicina Humana de la UCSM: integrar la bioinformática y la dinámica molecular como líneas formales de investigación de pregrado, dado que los resultados de esta tesis demuestran que son abordajes viables y de alto impacto para estudiantes de medicina.

REFERENCIAS

1. Ruze R, Liu T, Zou X, Song J, Chen Y, Xu R, et al. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Front Endocrinol.* 21 de abril de 2023;14. doi:10.3389/fendo.2023.1161521
2. Garvey WT, Batterham RL, Bhatta M, Buscemi S, Christensen LN, Frias JP, et al. Two-year effects of semaglutide in adults with overweight or obesity: the STEP 5 trial. *Nat Med.* octubre de 2022;28(10):2083-91. doi:10.1038/s41591-022-02026-4
3. Qin W, Yang J, Deng C, Ruan Q, Duan K. Efficacy and safety of semaglutide 2.4 mg for weight loss in overweight or obese adults without diabetes: An updated systematic review and meta-analysis including the 2-year STEP 5 trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2024;26(3):911-23. doi:10.1111/dom.15386
4. Wharton S, Calanna S, Davies M, Dicker D, Goldman B, Lingvay I, et al. Gastrointestinal tolerability of once-weekly semaglutide 2.4 mg in adults with overweight or obesity, and the relationship between gastrointestinal adverse events and weight loss. *Diabetes Obes Metab.* enero de 2022;24(1):94-105. doi:10.1111/dom.14551 PubMed PMID: 34514682; PubMed Central PMCID: PMC9293236.
5. Fang Z, Chen S, Manchanda Y, Bitsi S, Pickford P, David A, et al. Ligand-Specific Factors Influencing GLP-1 Receptor Post-Endocytic Trafficking and Degradation in Pancreatic Beta Cells. *International Journal of Molecular Sciences.* 8 de noviembre de 2020;21(21). doi:10.3390/ijms21218404
6. Manchanda Y, Bitsi S, Chen S, Broichhagen J, Bernardino de la Serna J, Jones B, et al. Enhanced Endosomal Signaling and Desensitization of GLP-1R vs GIPR in Pancreatic Beta Cells. *Endocrinology.* 13 de marzo de 2023;164(5). doi:10.1210/endocr/bqad028 PubMed PMID: 36774542.
7. Buckley ST, Bækdal TA, Vegge A, Maarbjerg SJ, Pyke C, Ahnfelt-Rønne J, et al. Transcellular stomach absorption of a derivatized glucagon-like peptide-1 receptor agonist. *Sci Transl Med.* 14 de noviembre de 2018;10(467):eaar7047. doi:10.1126/scitranslmed.aar7047 PubMed PMID: 30429357.

8. Baliou S, Apetroaei MM, Hatzidaki E, Kuzmin SV, Tzatzarakis MN, Arsene AL, et al. The Interplay Between Obesity and Type 2 Diabetes: Common Pathophysiological Mechanisms Contributing to Telomere Shortening. *Life*. junio de 2025;15(6):6. doi:10.3390/life15060873
9. Khan MAB, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Al Kaabi J. Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J Epidemiol Glob Health*. marzo de 2020;10(1):107-11. doi:10.2991/jegh.k.191028.001 PubMed PMID: 32175717; PubMed Central PMCID: PMC7310804.
10. Latorraca NR, Venkatakrishnan AJ, Dror RO. GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chem Rev*. 11 de enero de 2017;117(1):139-55. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00177
11. Dror RO, Pan AC, Arlow DH, Borhani DW, Maragakis P, Shan Y, et al. Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 9 de agosto de 2011;108(32):13118-23. doi:10.1073/pnas.1104614108
12. Zhang X, Belousoff MJ, Liang YL, Danev R, Sexton PM, Wootten D. Structure and dynamics of semaglutide- and taspoglutide-bound GLP-1R-Gs complexes. *Cell Reports*. julio de 2021;36(2):109374. doi:10.1016/j.celrep.2021.109374
13. Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, de Groot BL, et al. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods*. enero de 2017;14(1):71-3. doi:10.1038/nmeth.4067
14. Borner T, Tinsley IC, Doyle RP, Hayes MR, De Jonghe BC. Glucagon-like peptide-1 in diabetes care: Can glycaemic control be achieved without nausea and vomiting? *Br J Pharmacol*. febrero de 2022;179(4):542-56. doi:10.1111/bph.15647 PubMed PMID: 34363224; PubMed Central PMCID: PMC8810668.
15. Mahapatra MK, Karuppasamy M, Sahoo BM. Semaglutide, a glucagon like peptide-1 receptor agonist with cardiovascular benefits for management of type 2 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord*. 2022;23(3):521-39. doi:10.1007/s11154-021-09699-1 PubMed PMID: 34993760; PubMed Central PMCID: PMC8736331.

16. Deganutti G, Liang YL, Zhang X, Khoshouei M, Clydesdale L, Belousoff MJ, et al. Dynamics of GLP-1R peptide agonist engagement are correlated with kinetics of G protein activation. *Nat Commun.* 10 de enero de 2022;13(1):92. doi:10.1038/s41467-021-27760-0 PubMed PMID: 35013280; PubMed Central PMCID: PMC8748714.
17. Agarwal PN, Haworth IS. Oral absorption of semaglutide: pharmacokinetic modeling and molecular dynamics simulations. *In Silico Pharmacol.* 2025;13(2):103. doi:10.1007/s40203-025-00393-7 PubMed PMID: 40686549; PubMed Central PMCID: PMC12267729.
18. Barazorda-Ccahuana HL, Nedyalkova M, Mas F, Madurga S. Unveiling the Effect of Low pH on the SARS-CoV-2 Main Protease by Molecular Dynamics Simulations. *Polymers.* enero de 2021;13(21):21. doi:10.3390/polym13213823
19. Barazorda-Ccahuana HL, Ranilla LG, Candia-Puma MA, Cárcamo-Rodríguez EG, Centeno-Lopez AE, Davila-Del-Carpio G, et al. PeruNPDB: the Peruvian Natural Products Database for in silico drug screening. *Sci Rep.* 10 de mayo de 2023;13(1):7577. doi:10.1038/s41598-023-34729-0
20. Liang YL, Khoshouei M, Glukhova A, Furness SGB, Zhao P, Clydesdale L, et al. Phase-plate cryo-EM structure of a biased agonist-bound human GLP-1 receptor–Gs complex. *Nature.* marzo de 2018;555(7694):121-5. doi:10.1038/nature25773
21. Twarog C, Fattah S, Heade J, Maher S, Fattal E, Brayden DJ. Intestinal Permeation Enhancers for Oral Delivery of Macromolecules: A Comparison between Salcaprozate Sodium (SNAC) and Sodium Caprate (C10). *Pharmaceutics.* 13 de febrero de 2019;11(2):78. doi:10.3390/pharmaceutics11020078 PubMed PMID: 30781867; PubMed Central PMCID: PMC6410172.
22. Kawatani M, Yamada Y, Kawatani M. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) action in the mouse area postrema neurons. *Peptides.* septiembre de 2018;107:68-74. doi:10.1016/j.peptides.2018.07.010 PubMed PMID: 30081042.
23. Gabery S, Salinas CG, Paulsen SJ, Ahnfelt-Rønne J, Alanentalo T, Baquero AF, et al. Semaglutide lowers body weight in rodents via distributed neural pathways. *JCI Insight.* 26 de marzo de 2020;5(6):e133429, 133429. doi:10.1172/jci.insight.133429 PubMed PMID: 32213703; PubMed Central PMCID: PMC7213778.

24. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 1 de septiembre de 2015;1-2:19-25. doi:10.1016/j.softx.2015.06.001
25. Valdés-Tresanco MS, Valdés-Tresanco ME, Valiente PA, Moreno E. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *J Chem Theory Comput*. 12 de octubre de 2021;17(10):6281-91. doi:10.1021/acs.jctc.1c00645 PubMed PMID: 34586825.
26. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*. 2008;29(11):1859-65. doi:10.1002/jcc.20945
27. Jo S, Lim JB, Klauda JB, Im W. CHARMM-GUI Membrane Builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. *Biophys J*. 8 de julio de 2009;97(1):50-8. doi:10.1016/j.bpj.2009.04.013 PubMed PMID: 19580743; PubMed Central PMCID: PMC2711372.
28. Kandt C, Ash WL, Tieleman DP. Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Methods*. abril de 2007;41(4):475-88. doi:10.1016/j.ymeth.2006.08.006 PubMed PMID: 17367719.
29. Olsson MHM, Søndergaard CR, Rostkowski M, Jensen JH. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J Chem Theory Comput*. 8 de febrero de 2011;7(2):525-37. doi:10.1021/ct100578z
30. Knudsen LB, Lau J. The Discovery and Development of Liraglutide and Semaglutide. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:155. doi:10.3389/fendo.2019.00155 PubMed PMID: 31031702; PubMed Central PMCID: PMC6474072.
31. Radak BK, Chipot C, Suh D, Jo S, Jiang W, Phillips JC, et al. Constant-pH Molecular Dynamics Simulations for Large Biomolecular Systems. *J Chem Theory Comput*. 12 de diciembre de 2017;13(12):5933-44. doi:10.1021/acs.jctc.7b00875 PubMed PMID: 29111720; PubMed Central PMCID: PMC5726918.

32. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*. 1997;18(12):1463-72. doi:10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H
33. Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys*. 7 de enero de 2007;126(1):014101. doi:10.1063/1.2408420 PubMed PMID: 17212484.
34. Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG. A smooth particle mesh Ewald method. *J Chem Phys*. 15 de noviembre de 1995;103(19):8577-93. doi:10.1063/1.470117
35. McDonald IK, Thornton JM. Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J Mol Biol*. 20 de mayo de 1994;238(5):777-93. doi:10.1006/jmbi.1994.1334 PubMed PMID: 8182748.
36. Wickham H. ggplot2 [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado 13 de marzo de 2026]. (Use R!). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24277-4> doi:10.1007/978-3-319-24277-4
37. Wootten D, Reynolds CA, Smith KJ, Mobarec JC, Koole C, Savage EE, et al. The Extracellular Surface of the GLP-1 Receptor Is a Molecular Trigger for Biased Agonism. *Cell*. 16 de junio de 2016;165(7):1632-43. doi:10.1016/j.cell.2016.05.023 PubMed PMID: 27315480; PubMed Central PMCID: PMC4912689.
38. Xu S, Zhou G, Wu B, Liu TT. Molecular and Circuit Mechanisms Regulating Nausea and Vomiting: Recent Advances and Future Perspectives. *Neuropharmacology and Therapy*. 8 de octubre de 2024;1:31-45. doi:10.15212/npt-2024-0006
39. Borner T, Liberini CG, Lutz TA, Riediger T. Brainstem GLP-1 signalling contributes to cancer anorexia-cachexia syndrome in the rat. *Neuropharmacology*. 15 de marzo de 2018;131:282-90. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.12.024 PubMed PMID: 29247677.
40. Jones B, Buenaventura T, Kanda N, Chabosseau P, Owen BM, Scott R, et al. Targeting GLP-1 receptor trafficking to improve agonist efficacy. *Nat Commun*. 23 de abril de 2018;9(1):1602. doi:10.1038/s41467-018-03941-2 PubMed PMID: 29686402; PubMed Central PMCID: PMC5913239.

41. Wright SC, Motso A, Koutsilieri S, Beusch CM, Sabatier P, Berghella A, et al. GLP-1R signaling neighborhoods associate with the susceptibility to adverse drug reactions of incretin mimetics. *Nat Commun.* 9 de octubre de 2023;14(1):6243. doi:10.1038/s41467-023-41893-4 PubMed PMID: 37813859; PubMed Central PMCID: PMC10562414.
42. Bitsi S, El Eid L, Manchanda Y, Oqua AI, Mohamed N, Hansen B, et al. Divergent acute versus prolonged pharmacological GLP-1R responses in adult β cell-specific β -arrestin 2 knockout mice. *Sci Adv.* 3 de mayo de 2023;9(18):eadf7737. doi:10.1126/sciadv.adf7737 PubMed PMID: 37134170; PubMed Central PMCID: PMC10156113.



ANEXOS

ANEXO 1. FLEXIBILIDAD LOCAL POR RESIDUO (RMSF)

El análisis de RMSF confirma que las regiones de mayor flexibilidad en el receptor corresponden a los loops extracelulares (ECL1, ECL2, ECL3), mientras que el núcleo transmembrana permanece rígido en las tres condiciones. En semaglutida, los extremos N- y C-terminal muestran mayor movilidad que el segmento helicoidal central. Esta figura se incluye como Anexo dado que los datos de RMSD y radio de giro son suficientes para sostener las conclusiones sobre estabilidad en el cuerpo principal.

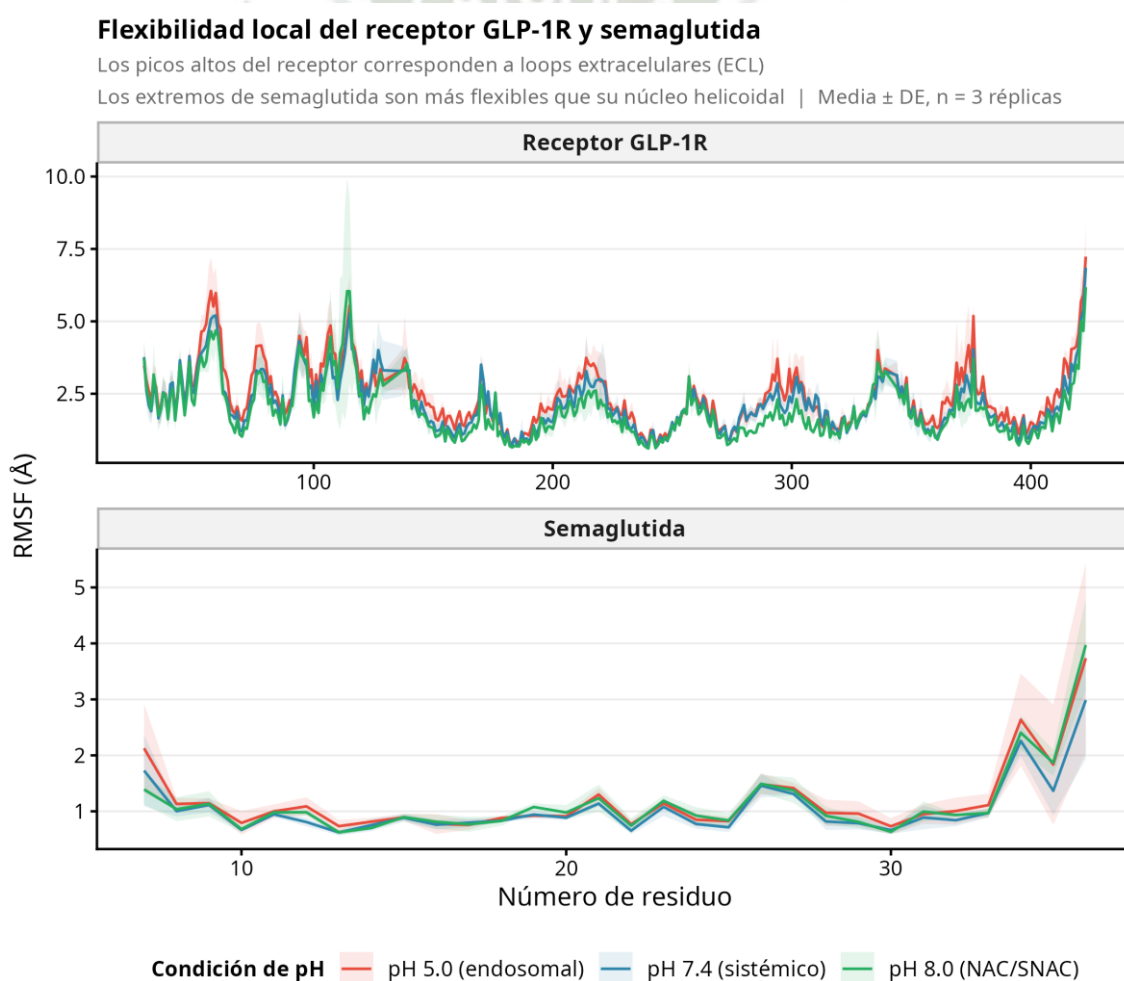


Figura A1. Flexibilidad local del receptor GLP-1R y de semaglutida por residuo (RMSF). Panel superior: los picos corresponden a los loops extracelulares (ECL1, ECL2, ECL3), que son las regiones más móviles del receptor; el núcleo de hélices transmembrana permanece rígido en las tres condiciones. Panel inferior: en semaglutida, los extremos N- y C-terminal

son más flexibles que el segmento helicoidal central, que es la región de contacto directo con el receptor. Media \pm DE, n = 3 réplicas.

ANEXO 2. DISTRIBUCIÓN DE HOTSPOTS POR CONTRIBUCIÓN VdW (GRÁFICO LOLLIPOP)

Representación alternativa al heatmap (Figura 7) que permite visualizar la distribución continua de hotspots por magnitud de contribución VdW a pH 7.4, con los valores a pH 5.0 y 8.0 superpuestos como marcadores. Confirma que el núcleo hidrofóbico (MET204, LEU183, LEU244, MET233, LEU166) permanece estable entre condiciones, mientras que el subconjunto de residuos pH-sensibles (rojo) muestra desplazamientos sistemáticos.

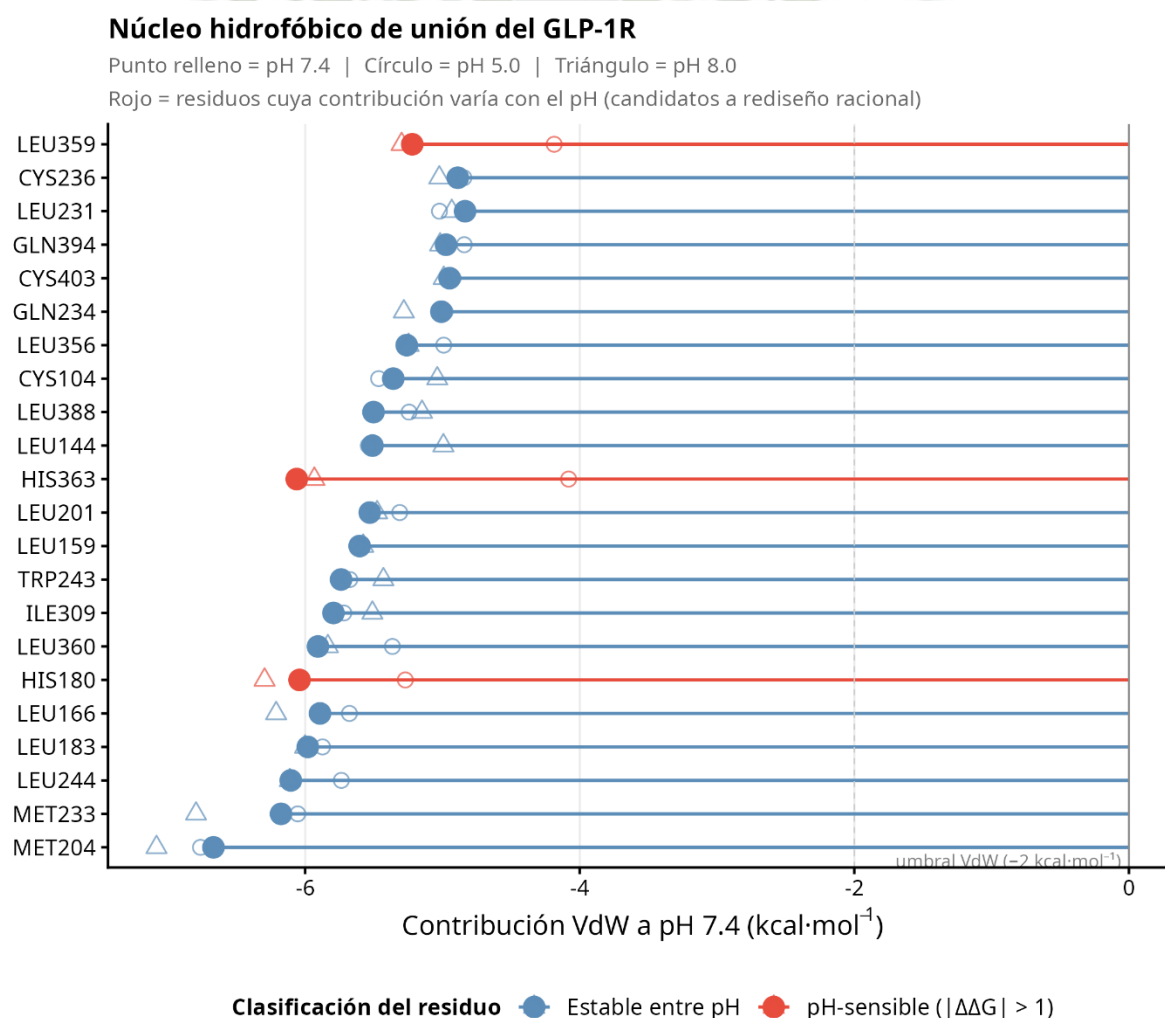


Figura A2. Distribución de la contribución VdW por residuo del núcleo hidrofóbico del GLP-1R (gráfico de barras horizontales). Cada línea muestra un residuo; los marcadores indican los

valores a pH 7.4 (punto relleno), pH 5.0 (círculo) y pH 8.0 (triángulo). Los residuos en rojo (HIS363, HIS180, LEU359) muestran variaciones dependientes del pH, confirmando su sensibilidad al entorno ácido. La mayoría del núcleo hidrofóbico (azul) permanece estable entre condiciones, coherente con la afinidad residual conservada a pH 5.0. GLU387 no aparece destacado aquí porque su sensibilidad al pH es de naturaleza electrostática, no hidrofóbica (ver Figura 7).

ANEXO 3. PARÁMETROS DE EQUILIBRACIÓN (STEP6.1-STEP6.6)

Las seis fases de equilibración siguen el protocolo estándar de CHARMM-GUI para sistemas GPCR-membrana. La tabla resume los parámetros clave de cada etapa:

Tabla 7. Protocolo de equilibración progresiva del sistema molecular (6 etapas, CHARMM-GUI)

Etapas	Ensemble	Duración	Termostato	Barostato	Restricciones proteína
step6.1	NVT	125 ps, dt=0.001 ps	v-rescale 310 K	Ninguno	4,000 kJ·mol ⁻¹ ·nm ⁻²
step6.2	NVT	125 ps, dt=0.001 ps	v-rescale 310 K	Ninguno	2,000 kJ·mol ⁻¹ ·nm ⁻²
step6.3	NVT	125 ps, dt=0.002 ps	v-rescale 310 K	Ninguno	1,000 kJ·mol ⁻¹ ·nm ⁻²
step6.4	NPT	500 ps, dt=0.002 ps	v-rescale 310 K	C-rescale semi-iso	500 kJ·mol ⁻¹ ·nm ⁻²
step6.5	NPT	500 ps, dt=0.002 ps	v-rescale 310 K	C-rescale semi-iso	200 kJ·mol ⁻¹ ·nm ⁻²
step6.6	NPT	500 ps, dt=0.002 ps	v-rescale 310 K	C-rescale semi-iso	Sin restricciones

NVT = simulación a volumen y temperatura constantes. NPT = simulación a presión y temperatura constantes. Las restricciones de posición se reducen progresivamente en cada etapa para permitir que el sistema se adapte gradualmente antes de la simulación libre de producción. Todos los sistemas (n = 9) siguieron el mismo protocolo.

C-rescale semi-isotrópico: P = 1.0 bar, $\tau = 5.0$ ps, compresibilidad 4.5×10^{-5} bar⁻¹. Los archivos .mdp completos de cada etapa están disponibles en el repositorio GitHub (Anexo 5).

ANEXO 4. TABLAS MEDIAS Y TUKEY HSD ADICIONALES

Tabla 8. Valores individuales y medias de ΔG binding por condición de pH

Condición fisiológica	pH	Media (kcal·mol ⁻¹)	DE	SEM	Réplicas
Endosomal tardío	5.0	-105.60	33.41	19.29	3
Sistémico / plasmático	7.4	-131.26	42.70	24.65	3
Gástrico / NAC-SNAC	8.0	-151.35	27.18	15.70	3

Nota: Cada valor corresponde a una réplica independiente. La media y DE de cada grupo coinciden con los reportados en la Tabla 3. Se incluyen los valores individuales para transparencia y reproducibilidad del análisis estadístico.

Tabla 9. Comparaciones por pares entre condiciones de pH, post-hoc Tukey HSD

Comparación	Diferencia (kcal·mol ⁻¹)	IC 95% inferior	IC 95% superior	p ajustada	Significancia
pH 7.4 - pH 5.0	-25.66	-113.38	62.07	0.661	ns
pH 8.0 - pH 5.0	-45.75	-133.47	41.98	0.316	ns
pH 8.0 - pH 7.4	-20.09	-107.81	67.63	0.771	ns

Nota: Diferencia = media(condición A), media(condición B). IC 95%: intervalo de confianza calculado con el método Tukey (familywise, controla error tipo I en comparaciones múltiples). ns = no significativo ($p > 0.05$). La falta de significación refleja la baja potencia estadística con $n = 3$ réplicas, no ausencia de efecto biológico ($\eta^2 = 0.300$, ver Tabla 4).

ANEXO 5. CÓDIGO FUENTE Y ARCHIVOS DE SIMULACIÓN

El pipeline computacional completo utilizado en esta tesis, incluyendo los scripts de simulación (GROMACS), análisis estructural, cálculo de energía libre MM-GBSA, identificación de hotspots (Python), visualización molecular (ChimeraX) y generación de figuras (R), está disponible públicamente en el siguiente repositorio:

<https://github.com/Mortis37/Tesis-Medicina-Semaglutide>

El repositorio incluye:

- Los archivos de configuración CHARMM-GUI para las tres condiciones de pH (step5_input.pdb, topol.top, index.ndx, toppar/).
- Los parámetros exactos del protocolo de simulación (step6.0-step7_production.mdp).
- Los scripts de análisis estructural (RMSD, RMSF, radio de giro, puentes de hidrógeno), cálculo MM-GBSA, identificación de hotspots y generación de figuras.

El repositorio permite la reproducción completa de los resultados reportados en esta tesis a partir de los archivos de configuración incluidos.

ANEXO 6. CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO SEMAGLUTIDA-GLP-1R Y DEL SISTEMA DE SIMULACIÓN

Tabla 10. Caracterización del complejo semaglutida-GLP-1R y del sistema de simulación

Parámetro	Valor
SEMAGLUTIDA	
Secuencia canónica	31 aminoácidos - GLP-1(7-37)
Residuos resueltos en PDB 7KI0	30 residuos (posiciones 7-36); Gly37 no resuelto por flexibilidad del extremo C-terminal en cryo-EM
Peso molecular	4,113.58 Da (secuencia completa + cadena grasa C18)
Modificaciones clave	Ala ⁸ →AIB (resistencia DPP-4); cadena grasa C18 en Lys26 (vida media ~168 h); Lys ³⁴ →Arg
Cadena C18 en simulación	NO modelada - no resuelta en PDB 7KI0; Lys26 tratada como lisina estándar. No afecta interfaz de unión (ver Limitaciones)
Segmento en simulación	PROA - 464 átomos, 119 backbone; residuos 7-36
Estructura de origen	Cadena P, PDB 7KI0 (cryo-EM, Zhang et al. 2021 [12])
RECEPTOR GLP-1R	
Clasificación	GPCR de clase B1 (familia de secretina)
Longitud canónica	463 aminoácidos (UniProt P43220, GLP1R_HUMAN)
Peso molecular	~53 kDa
Estructura transmembrana	7 hélices transmembrana (TM1-TM7)
Dominio extracelular (ECD)	~120 residuos N-terminales
Loops extracelulares	ECL1 (His180), ECL2 (His212), ECL3
Residuos reconstruidos	Segmento 29-36 via CHARMM-GUI + UniProt P43220
Segmento en simulación	PROB - 6,338 átomos
Estructura de origen	Cadena R, PDB 7KI0 (cryo-EM, Zhang et al. 2021 [12])
SISTEMA COMPLETO	
Átomos del complejo (SOLU)	6,802 átomos
Membrana (MEMB)	Bicapa POPC, 140 lípidos - 18,760 átomos
Solvente	20,375 moléculas TIP3P + NaCl 150 mM (114 iones)
Átomos totales	~86,789 átomos
Caja de simulación	Ortorómbica, ~7.7 × 7.7 × 15.5 nm
Resolución estructura base	2.5 Å (cryo-EM)

AIB = ácido α -aminoisobutírico. GPCR = G Protein-Coupled Receptor. POPC = 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina. kDa = kilodalton. Fuentes: UniProt P43220; PDB 7KI0; Knudsen & Lau 2019 (30); Zhang et al. 2021 (12).

ANEXO 7. VALIDACIÓN DE LA POSE DE UNIÓN DE SEMAGLUTIDA (RMSD VS. PDB 7KI0)

La pose de semaglutida fue tomada directamente de la estructura experimental PDB 7KI0, sin procedimiento de docking. Para verificar que la preparación del sistema no desplazó al péptido de su posición cristalográfica, se calculó el RMSD backbone en el primer frame de producción

respecto a step5_input.gro (pre-equilibración), usando gmx rms sobre el segmento PROA (119 átomos backbone), con ajuste rot+trans, conversión nm \rightarrow Å.

Tabla 11. RMSD backbone de semaglutida al inicio de producción vs. estructura cristalográfica

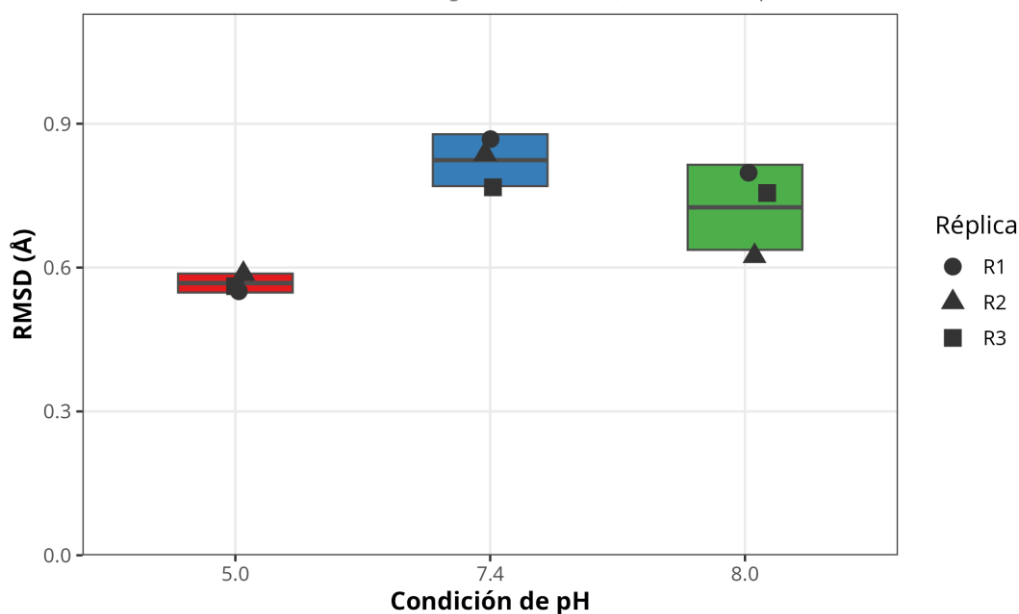
Réplica	pH 5.0 (endosomal)	pH 7.4 (sistémico)	pH 8.0 (SNAC)
R1	0.55 Å	0.87 Å	0.80 Å
R2	0.59 Å	0.84 Å	0.63 Å
R3	0.56 Å	0.76 Å	0.76 Å
Media \pm DE	0.57 \pm 0.02 Å	0.82 \pm 0.06 Å	0.73 \pm 0.09 Å

Umbral de aceptación: < 1.5 Å (10). Todos los valores cumplen el criterio. gmx rms, backbone PROA 119 átomos, fit rot+trans, primer frame step7_1.xtc.

ANEXO 8. VALIDACIÓN DE LA POSE DE UNIÓN - DIAGRAMA DE CAJAS POR CONDICIÓN DE PH

Validación de la pose de unión de semaglutida

RMSD backbone vs estructura cristalográfica (PDB 7KI0) al inicio de la producción



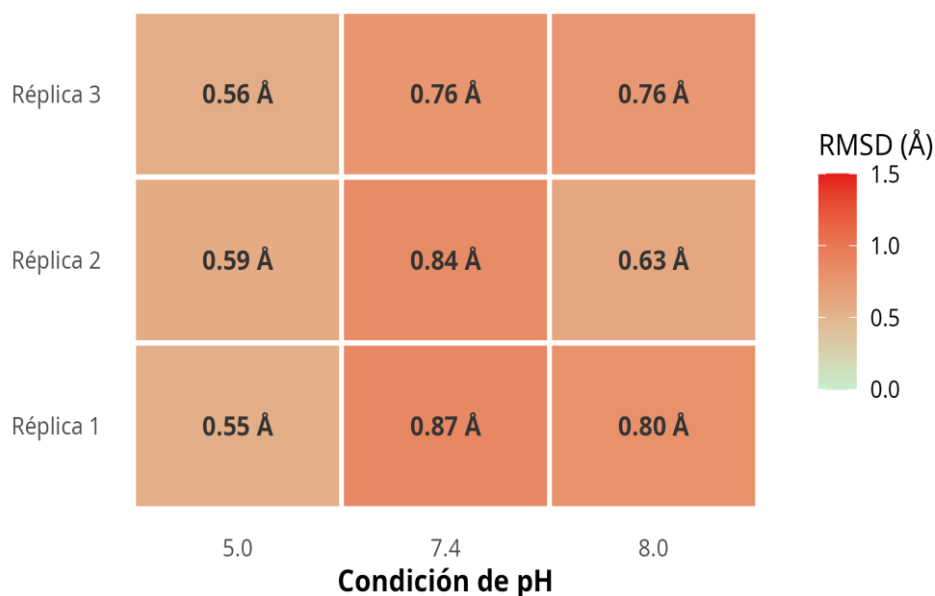
Backbone C α de semaglutida; primer frame de step7_1.xtc; fit rot+trans.
Valores < 1.5 Å confirman preservación de la pose helicoidal experimental tras la equilibración.

Figura A3. RMSD backbone de semaglutida respecto a PDB 7KI0 al inicio de la trayectoria de producción (n = 3 réplicas por condición). La línea discontinua marca el umbral de 1.5 Å.

Todos los valores (0.55-0.87 Å) se encuentran por debajo del umbral, confirmando la preservación de la pose helicoidal experimental en los nueve sistemas simulados.

ANEXO 9. MAPA DE CALOR DE VALORES INDIVIDUALES DE RMSD (RÉPLICA × CONDICIÓN DE PH)

Tabla de validación: RMSD semaglutida vs PDB 7K10



Verde = pose bien conservada; rojo = desviación mayor al umbral de 1.5 Å

Figura A4. Valores individuales de RMSD backbone de semaglutida (Å) por réplica y condición de pH. Escala de color: verde = conservación perfecta (0 Å); rojo = umbral 1.5 Å. Los nueve valores (0.55-0.87 Å) indican conservación uniforme en todas las condiciones.

Tabla 12. Tabla de pKa por residuo (PropKa 3.0)

Residuo	Tipo	pKa	Localización	pH 5.0	pH 7.4	pH 8.0	pH-sensible
Histidinas pH-sensibles del GLP-1R (cadena R)							
His99	HIS	6.16	N-terminal extracelular	HSP (+1)	HSD (0)	HSD (0)	Si
His171	HIS	7.08	N-terminal / TM1	HSP (+1)	HSD (0)	HSD (0)	Si
His173	HIS	5.97	N-terminal extracelular	HSP (+1)	HSD (0)	HSD (0)	Si
His180	HIS	6.35	ECL1 - contacto ligando	HSP (+1)	HSD (0)	HSD (0)	Si
His212	HIS	6.37	ECL2	HSP (+1)	HSD (0)	HSD (0)	Si
His363	HIS	7.95	TM6 (transmembrana)	HSP (+1)	HSD (0)	HSD (0)	Si
His374	HIS	6.35	TM6 / TM7	HSP (+1)	HSD (0)	HSD (0)	Si
Ácido aspártico (Asp) - muestra representativa							
Asp59	ASP	4.11	N-terminal extracelular	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	No
Asp67	ASP	3.28	N-terminal extracelular	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	No
Asp74	ASP	4.11	N-terminal extracelular	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	No
Asp114	ASP	4.20	N-terminal extracelular	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	No
Asp344	ASP	4.55	TM5	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	No
Asp372	ASP	0.44	TM6	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	No
Ácido glutámico (Glu) - muestra representativa							
Glu9	GLU	3.12	Semaglutida (P)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	No
Glu41	GLU	3.67	N-terminal extracelular	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	No
Glu294	GLU	4.67	TM4-TM5	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	No
Glu387	GLU	6.25	TM6 (hotspot)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	No
Glu408	GLU	5.11	TM7	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	No
Glu412	GLU	4.73	TM7	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	COO ⁻ (-1)	No
Lisina (Lys) - muestra representativa							
Lys26	LYS	9.69	Semaglutida (P)	NH ₃ ⁺ (+1)	NH ₃ ⁺ (+1)	NH ₃ ⁺ (+1)	No
Lys197	LYS	10.22	TM2	NH ₃ ⁺ (+1)	NH ₃ ⁺ (+1)	NH ₃ ⁺ (+1)	No
Lys288	LYS	8.25	TM4	NH ₃ ⁺ (+1)	NH ₃ ⁺ (+1)	NH ₃ ⁺ (+1)	No
Lys346	LYS	10.11	TM5	NH ₃ ⁺ (+1)	NH ₃ ⁺ (+1)	NH ₃ ⁺ (+1)	No
Lys383	LYS	10.17	TM6	NH ₃ ⁺ (+1)	NH ₃ ⁺ (+1)	NH ₃ ⁺ (+1)	No
Lys415	LYS	9.68	TM7	NH ₃ ⁺ (+1)	NH ₃ ⁺ (+1)	NH ₃ ⁺ (+1)	No
Arginina (Arg) - muestra representativa							
Arg176	ARG	15.26	ECL1	Guan ⁺ (+1)	Guan ⁺ (+1)	Guan ⁺ (+1)	No
Arg190	ARG	17.60	TM2	Guan ⁺ (+1)	Guan ⁺ (+1)	Guan ⁺ (+1)	No
Arg227	ARG	14.56	TM3	Guan ⁺ (+1)	Guan ⁺ (+1)	Guan ⁺ (+1)	No
Arg310	ARG	11.98	TM5	Guan ⁺ (+1)	Guan ⁺ (+1)	Guan ⁺ (+1)	No
Arg376	ARG	11.06	TM6	Guan ⁺ (+1)	Guan ⁺ (+1)	Guan ⁺ (+1)	No
Arg419	ARG	11.47	TM7	Guan ⁺ (+1)	Guan ⁺ (+1)	Guan ⁺ (+1)	No

Nota: Los valores de pKa fueron calculados sobre la estructura cristalográfica PDB 7KI0

(Zhang et al. 2021) mediante PropKa 3.0 (Olsson et al. 2011)(29). HSP = histidina doblemente protonada (N δ y N ϵ , carga +1); HSD = histidina neutra (protonada en N δ , carga 0). Los residuos Asp/Glu con pKa < 5.0 permanecen desprotonados (carga -1) y los residuos Lys/Arg con pKa > 8.0 permanecen protonados (carga +1) en las tres condiciones simuladas (pH 5.0, 7.4 y 8.0). Solo las siete histidinas listadas presentan pKa dentro del rango de estudio y cambian de estado exclusivamente a pH 5.0. Muestra representativa: se incluyen los residuos más relevantes de cada tipo; la lista completa comprende 13 Asp, 26 Glu, 12 Lys y 23 Arg del GLP-1R.

GLOSARIO

A

AIB (ácido α -aminoisobutírico)

Aminoácido no proteogénico que sustituye a la alanina en la posición 8 de semaglutida. Su estructura carece de hidrógeno en el carbono α , bloqueando físicamente la acción de la DPP-4. No posee grupo ionizable en el rango pH 5.0–8.0, por lo que no cambia de carga en ninguna condición simulada.

Alanine scanning

Estrategia de mutagénesis dirigida en la que cada residuo de interés se sustituye individualmente por alanina. Como la alanina aporta solo una cadena metilo, cualquier pérdida de función tras la sustitución señala que ese residuo es funcionalmente crítico (hotspot). Es el experimento de validación propuesto para confirmar los hotspots pH-sensibles identificados computacionalmente.

ANOVA de una vía

Prueba estadística que compara las medias de tres o más grupos independientes. Aquí se aplicó sobre el ΔG binding a pH 5.0, 7.4 y 8.0 [$F(2,6) = 1.286$; $p = 0.343$]. La ausencia de significación formal se atribuye a la baja potencia estadística con $n = 3$ réplicas, no a ausencia de efecto biológico ($\eta^2 = 0.300$).

B

BRET (transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia)

Técnica que detecta interacciones proteína-proteína en células vivas midiendo la transferencia de energía entre una proteína bioluminiscente donante y una fluorescente aceptora. Se usa para cuantificar el reclutamiento de β -arrestina al GLP-1R en tiempo real y es uno de los ensayos de validación propuestos.

C

Campo de fuerzas CHARMM36m

Conjunto de parámetros matemáticos (longitudes de enlace, ángulos, cargas parciales, constantes de van der Waals) que describe cómo interactúan los átomos del sistema durante la simulación. La versión 36m está optimizada para proteínas en membrana lipídica y es el estándar actual para simulaciones de GPCRs.

CBCRG (Computational Biology and Chemistry Research Group)

Grupo de investigación de la Universidad Católica de Santa María (Arequipa) especializado en dinámica molecular y bioinformática estructural. Proporcionó la infraestructura computacional y el marco metodológico del estudio.

CHARMM-GUI

Plataforma web que automatiza la construcción de sistemas moleculares para dinámica molecular. En este estudio generó la bicapa POPC, insertó el complejo GLP-1R–semaglutida, asignó estados de protonación mediante PropKa 3.0 y produjo todos los archivos de configuración para GROMACS.

ChimeraX

Software de visualización molecular (versión 1.8) utilizado para generar las representaciones tridimensionales del complejo y de los estados de protonación de las histidinas. Las figuras corresponden a frames del tiempo $t = 175$ ns, réplica 2.

Condiciones periódicas de contorno (PBC)

Artificio matemático que replica la caja de simulación en todas las direcciones para eliminar efectos de borde. El sistema se comporta como si estuviera rodeado de copias idénticas de sí mismo, aproximando un entorno macroscópico.

Convergencia (de trayectoria)

Estado en el que las propiedades del sistema dejan de cambiar sistemáticamente con el tiempo. Se evaluó mediante el RMSD del backbone: se consideró convergido cuando la variación entre bloques consecutivos de 50 ns era < 0.05 nm. Todas las réplicas convergieron antes de los 100 ns, validando la ventana 150–200 ns.

CpHMD (dinámica molecular a pH constante)

Método avanzado que permite actualizar los estados de protonación de los residuos dinámicamente durante la simulación. No fue implementado por incompatibilidad con CHARMM36m en sistemas con membrana explícita; en su lugar se utilizó protonación constante fija asignada por PropKa 3.0.

Cryo-EM (criomicroscopía electrónica)

Técnica de determinación estructural que resuelve macromoléculas a resolución atómica a partir de muestras vitrificadas. La estructura de partida (PDB 7KI0, 2.5 Å) fue obtenida por este método y constituye la fuente experimental de la pose de unión de semaglutida.

D

Descomposición energética pairwise (por residuo)

Análisis que desglosa la energía libre de unión total en contribuciones individuales de cada par residuo del receptor–ligando. Permite identificar qué aminoácidos específicos aportan más a la estabilidad del complejo. Se ejecutó con el parámetro $idecomp=2$ en `gmx_MMPBSA`.

DPP-4 (dipeptidil peptidasa-4)

Enzima proteolítica plasmática que inactiva el GLP-1 nativo escindiendo su dipéptido N-terminal en la posición 8 (Ala8), reduciendo la vida media a ~2 minutos. La sustitución Ala8→AIB en semaglutida fue diseñada específicamente para bloquear este sitio de corte.

E

Energía libre de unión (ΔG binding)

Magnitud termodinámica que cuantifica la estabilidad de un complejo molecular; valores más negativos indican mayor afinidad. Calculada por MM-GBSA, es válida para comparaciones relativas entre condiciones sometidas al mismo protocolo, pero no equivale a constantes de disociación (K_d) experimentales porque omite la contribución entrópica conformacional.

Equilibración progresiva

Fase previa a la producción en la que el sistema evoluciona desde la configuración inicial hasta el equilibrio termodinámico. Se realizaron seis etapas (step6.1–step6.6) reduciendo gradualmente las restricciones de posición sobre la proteína e introduciendo el control de presión, según el protocolo estándar de CHARMM-GUI para sistemas GPCR-membrana.

Eta cuadrado (η^2)

Medida del tamaño del efecto en el ANOVA: proporción de la varianza total explicada por la variable independiente. $\eta^2 = 0.300$ indica que el pH explica el 30% de la varianza del ΔG binding, lo que corresponde a un efecto grande (criterio Cohen 1988), independientemente de la significación estadística formal.

F

Frame

Instantánea de las posiciones atómicas del sistema guardada a un instante dado. En este estudio se almacenó 1 frame cada 50 ps, generando 4,000 frames por trayectoria (36,000 en total). El cálculo de MM-GBSA se realizó sobre los frames 3,000–4,000 (ventana 150–200 ns).

G

`gmx_MMPBSA`

Herramienta de software (v1.6.4) que implementa el método MM-GBSA a partir de trayectorias de GROMACS. Permite la descomposición energética por residuo ($idecomp$) y fue utilizada para calcular la energía libre de unión en las nueve trayectorias del estudio.

GPCR de clase B1

Subfamilia de receptores acoplados a proteína G caracterizados por un extenso dominio N-terminal extracelular y por reconocer péptidos hormonales de tamaño mediano (GLP-1, GIP, glucagón, PTH, entre otros). La clase B1 incluye el GLP-1R y el receptor de GIP (GIPR). Son especialmente relevantes terapéuticamente y presentan desafíos técnicos particulares para la simulación por estar embebidos en membrana.

GROMACS

Software de dinámica molecular de alto rendimiento y código abierto. En este estudio se utilizó la versión 2025.3, con aceleración GPU (CUDA 13.0) en la GPU NVIDIA RTX 4090 del CBCRG-UCSM.

H

Histidinas pH-sensibles

Los siete residuos del GLP-1R (His99, His171, His173, His180, His212, His363, His374) cuyo pKa estimado por PropKa 3.0 cae entre 5.97 y 7.95. Son los únicos residuos del complejo que cambian de estado de protonación entre las condiciones simuladas: permanecen neutros (HSD) a pH 7.4 y 8.0, y adquieren carga positiva (HSP, +1) a pH 5.0. Su protonación simultánea explica la reducción del 36% en puentes de hidrógeno interfaciales a pH endosomal.

Hotspot farmacológico

Residuo receptor con contribución energética desproporcionada a la afinidad de unión del ligando. En este estudio se definieron como residuos con ΔG pairwise ≤ -5.0 kcal·mol⁻¹ en al menos una condición. Se identificaron 22 en total; 11 son pH-sensibles ($|\Delta\Delta G| > 1.0$ kcal·mol⁻¹ entre pH 5.0 y 7.4) y constituyen las dianas candidatas para el rediseño racional de análogos.

HSD / HSP / HSE

Nomenclatura de CHARMM36m para los estados de protonación de la histidina. HSD: protón en el nitrógeno N δ , carga neutra (estado a pH 7.4 y 8.0). HSE: protón en el nitrógeno N ϵ , también neutro. HSP: ambos nitrógenos protonados simultáneamente, carga +1 (estado adoptado por las siete histidinas pH-sensibles del GLP-1R a pH 5.0).

I

idecomp

Parámetro de gmx_MMPBSA que define el tipo de descomposición energética por residuo. El valor 2 (utilizado en la tesis) calcula contribuciones pairwise receptor–ligando para cada residuo del receptor, separando los componentes de van der Waals, electrostática y solvatación. Los residuos Arg se excluyeron por sobreestimación conocida de su componente electrostático en el modelo GB.

K

Kd (constante de disociación)

Parámetro experimental que cuantifica la afinidad ligando-receptor: a menor Kd, mayor afinidad. Los valores de ΔG calculados por MM-GBSA no son equivalentes a Kd porque el método omite la contribución entrópica conformacional y usa solvatación implícita. Su utilidad en la tesis es estrictamente comparativa entre condiciones.

L**LINCS**

Algoritmo (Linear Constraint Solver) que mantiene fijos los enlaces de hidrógeno durante la simulación, permitiendo un paso de integración de 2 fs. Sin esta restricción sería necesario reducir el paso a ~ 0.5 fs, multiplicando el coste computacional por cuatro. Es el estándar para simulaciones de biomoléculas con CHARMM36m.

Lys26 / cadena grasa C18

La lisina 26 de semaglutida es el sitio de conjugación de una cadena grasa de 18 carbonos (C18) que media la unión a albúmina sérica y extiende la vida media del fármaco a ~ 168 horas. En PDB 7KI0 esta cadena no está resuelta y no forma parte de la interfaz de unión con el GLP-1R, por lo que no fue modelada en las simulaciones.

M**Membrana POPC explícita**

Bicapa lipídica compuesta por 140 moléculas de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), hidratada con agua TIP3P y iones NaCl 150 mM. Reproducir la membrana de forma explícita, en lugar de usar solvente homogéneo, es esencial para simular correctamente la dinámica del GLP-1R, cuyas hélices transmembrana están ancladas en la bicapa y cuya conformación depende de la presión lateral lipídica.

Minimización de energía

Primera fase del protocolo: desplazamiento de los átomos para eliminar choques estéricos generados durante el ensamblaje del sistema. Se usó el algoritmo steepest descent (5,000 pasos; fuerza máxima residual $< 1,000 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1}$).

MM-GBSA

Método endpoint para el cálculo de energía libre de unión que combina energía potencial de mecánica molecular con un modelo de solvatación implícita de Born generalizado (GB). No requiere simulaciones separadas del estado de transición. Sus limitaciones principales son la omisión de la entropía conformacional y la posible sobreestimación de interacciones electrostáticas, compensadas por su bajo coste computacional y capacidad de descomposición por residuo.

N**Nanosegundo (ns)**

Unidad de tiempo equivalente a 10^{-9} segundos, estándar para describir la duración de simulaciones de dinámica molecular de proteínas en membrana. Cada trayectoria duró 200 ns; el conjunto total de 9 réplicas acumuló 1,800 ns.

Núcleo hidrofóbico de anclaje

Conjunto de residuos apolares del GLP-1R (MET204, LEU183, MET233, LEU244, LEU166) cuyas interacciones de van der Waals con semaglutida permanecen prácticamente invariantes entre pH 5.0 y 8.0. Este núcleo es el responsable de que el complejo mantenga $\Delta G = -105.60$ kcal·mol⁻¹ incluso a pH endosomal, sin disociarse espontáneamente.

O**Órganos circunventriculares**

Regiones del SNC que carecen de barrera hematoencefálica efectiva por la presencia de capilares fenestrados, permitiendo el acceso directo de moléculas circulantes al tejido nervioso. El área postrema es el órgano circunventricular más relevante para la respuesta emética y la regulación del apetito, y es la principal ruta de acceso de semaglutida al SNC.

P**PDB 7KI0**

Estructura de cryo-EM del complejo GLP-1R–semaglutida–proteína Gs resuelta a 2.5 Å por Zhang et al. (Cell Reports, 2021). Fue la fuente experimental de la pose de unión utilizada en todas las simulaciones. Se extrajeron las cadenas R (GLP-1R) y P (semaglutida), eliminando los componentes de Gs y nanobody.

pH endosomal

El pH del compartimento endosomal desciende progresivamente desde ~6.5 (endosoma temprano) hasta ~5.0 (endosoma tardío) por acción de bombas protónicas vacuolares (V-ATPasas). Este es el contexto fisiológico clave del estudio: la hipótesis plantea que la afinidad residual de semaglutida a pH 5.0 impide la disociación del complejo y prolonga la señalización intracelular.

pKa

pH al que el 50% de un grupo ionizable está protonado y el 50% desprotonado. Un residuo con pKa dentro del rango de pH estudiado (5.0–8.0) cambia de estado de carga al variar el entorno. Las siete histidinas pH-sensibles del GLP-1R tienen pKa entre 5.97 y 7.95, siendo los únicos residuos del complejo que cambian de estado entre las tres condiciones simuladas.

PME (Particle Mesh Ewald)

Método para calcular interacciones electrostáticas de largo alcance con alta precisión en sistemas con condiciones periódicas de contorno. Divide el cálculo entre el espacio real (corto alcance) y el espacio recíproco (largo alcance) mediante transformada de Fourier. Estándar para simulaciones de biomoléculas cargadas. Se usó con $r_{coulomb} = 1.2 \text{ nm}$.

POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfolina)

Fosfolípido mayoritario de la membrana plasmática de células de mamífero, con una cadena saturada C16 en sn-1 y una insaturada C18:1 en sn-2. El doble enlace cis de la cadena oleoil mantiene la fluidez de la membrana a temperatura fisiológica. Es el lípido modelo estándar para simulaciones de GPCRs en membrana explícita.

PropKa 3.0

Programa de predicción de pKa de residuos ionizables en proteínas, integrado en CHARMM-GUI. Analiza el microentorno electrostático de cada aminoácido en la estructura tridimensional y estima su pKa mediante parámetros empíricos. Permite asignar los estados de protonación apropiados para cada condición de pH antes de iniciar la simulación.

Protonación constante fija

Enfoque metodológico en el que los estados de protonación se asignan al inicio de la simulación y no cambian durante la trayectoria, independientemente de los cambios en el microentorno local. Es la aproximación utilizada en esta tesis (por compatibilidad con CHARMM36m en membrana), en contraste con el CpHMD que actualiza las cargas dinámicamente.

Puentes de hidrógeno interfaciales

Interacciones no covalentes entre un átomo donador de hidrógeno (N-H u O-H) y un aceptor electronegativo (N u O) de la molécula adyacente. Contribuyen a la estabilidad del complejo semaglutida-GLP-1R. Se cuantificaron con criterio geométrico estándar (distancia donador-aceptor $\leq 3.5 \text{ \AA}$, ángulo $\leq 30^\circ$) mediante gmx hbond. La protonación de las histidinas a pH 5.0 reduce su número en un 36% (de 15.2 ± 5.5 a 9.7 ± 3.0).

R

Radio de giro (Rg)

Distribución de masa respecto al centro geométrico del complejo. Un Rg estable confirma ausencia de desplegamiento o compactación global durante la simulación. En este estudio no mostró variaciones marcadas entre condiciones de pH.

Réplica independiente

Trayectoria de DM que parte de las mismas condiciones iniciales pero con velocidades atómicas asignadas aleatoriamente mediante una semilla distinta. Las tres réplicas por condición ($n = 3$)

permiten estimar la variabilidad estadística del método y verificar reproducibilidad. Cada réplica aportó 200 ns, totalizando 600 ns por condición y 1,800 ns en conjunto.

RMSD (desviación cuadrática media de posición)

Métrica que cuantifica cuánto se ha desplazado el backbone de una proteína respecto a una referencia. Se usó de dos maneras: (1) para evaluar convergencia de las trayectorias respecto al frame inicial, y (2) para validar la pose de unión de semaglutida respecto a PDB 7KI0 al inicio de cada producción (valores 0.57–0.82 Å, todos < umbral de 1.5 Å).

RMSF (fluctuación cuadrática media por residuo)

Movilidad promedio de cada residuo a lo largo de la trayectoria. Valores altos indican regiones más flexibles. Los loops extracelulares (ECL1, ECL2, ECL3) mostraron la mayor flexibilidad del GLP-1R; el núcleo transmembrana permaneció rígido. En semaglutida, los extremos N- y C-terminal fluctuaron más que el segmento helicoidal central en contacto directo con el receptor.

S

SNAC (salcaprozato de sodio)

Excipiente de la formulación oral de semaglutida (Rybelsus®). Genera un microambiente alcalino localizado (pH ~8.0) bajo la tableta en la mucosa gástrica, protegiendo al péptido de la degradación por pepsina y facilitando su absorción transcelular sin alterar las uniones estrechas. Esta tercera condición de pH fue incluida en el diseño experimental.

T

Tamaño del efecto (η^2)

Ver eta cuadrado.

Termostato v-rescale

Algoritmo de control de temperatura que mantiene el sistema a 310.15 K (37°C) mediante reescalado estocástico de velocidades. Genera un ensamble canónico estadísticamente correcto, a diferencia del termostato de Berendsen. Se aplicó por separado a tres grupos del sistema (proteína, membrana, solvente+iones).

TIP3P

Modelo de agua de tres sitios de interacción ampliamente utilizado con el campo de fuerzas CHARMM36m. En este estudio, 20,375 moléculas TIP3P solvataron el sistema, representando el entorno acuoso fisiológico a ambos lados de la bicapa.

Tukey HSD

Prueba post-hoc para comparaciones múltiples entre grupos que controla la tasa de error familiar. En la tesis, ninguna comparación por pares entre condiciones de pH alcanzó significación ($p = 0.316-0.771$), reflejo de la baja potencia estadística con $n = 3$ réplicas.

V

V-ATPasa (ATPasa vacuolar)

Bomba protonica que acidifica el lumen endosomal y lisosomal utilizando energía del ATP. Es el mecanismo celular que genera el gradiente de pH desde ~ 7.4 en la membrana plasmática hasta ~ 5.0 en el endosoma tardío, contexto fisiológico central del estudio.

Van der Waals (VdW)

Interacciones no covalentes entre átomos apolares, descritas en CHARMM36m por el potencial de Lennard-Jones. Son el componente dominante de la energía libre de unión en el complejo semaglutida-GLP-1R y permanecen prácticamente invariantes entre condiciones de pH, explicando que el complejo no se disocia espontáneamente a pH endosomal.

VOSviewer

Software de visualización de redes bibliométricas (v1.6.20) utilizado para el análisis de co-ocurrencia de términos en PubMed. El mapa generado en la tesis mostró que la intersección entre dinámica molecular del GLP-1R y el eje pH/endosoma está bibliométricamente subrepresentada, justificando la originalidad del estudio.

Δ

$\Delta\Delta G$

Diferencia de energía libre de unión entre dos condiciones de pH. Cuantifica la sensibilidad al pH de cada residuo o del complejo en su conjunto. Se definieron como pH-sensibles los hotspots con $|\Delta\Delta G| > 1.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ entre pH 5.0 y 7.4. El mayor fue el de GLU387 ($|\Delta\Delta G| \approx 31 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$).