



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**Efecto del pH sobre la estabilidad y estructura de la β -glucuronidasa de
Escherichia coli y *Eubacterium eligens* aplicando métodos bioinformáticos**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Autor

Carmen Liliana Raraz Rivera

Asesor

Dra. Claudia Ines Gloria Machicado Rivero

Lima, Perú

2025

Jurado calificador

Presidente: Dr. Billy Joel Cabanillas Amado

Vocal: Dr. Wilfredo Evangelista Falcon

Secretario: Mag. Gervasio Coronel Molina

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N ^o	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	RARAZ RIVERA CARMEN LILIANA

Pertencientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**, autores del trabajo titulado: **Efecto del pH sobre la estabilidad y estructura de la β -glucuronidasa de *Escherichia coli* y *Eubacterium eligens* aplicando métodos bioinformáticos**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO** bajo la modalidad de **TESIS**.

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

N ^o	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	MACHICADO RIVERO CLAUDIA INES GLORIA	FACI	ASESOR

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

- El documento presenta un porcentaje de similitud de 7%, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3433443937**; fecha de entrega: **04/12/2025**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 04 de diciembre de 2025**



Firma del asesor

N° DNI: 10281611

ORCID: 0000-0001-6140-2423

Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 La microbiota humana.....	3
1.1.1 Composición de la microbiota.....	3
1.1.2 Importancia de la microbiota.....	3
1.2 Tratamiento anticancerígeno con irinotecan y el rol de la β GLU en su metabolismo.....	4
1.2.1 Cáncer y tratamiento.....	4
1.2.2 Toxicidad por irinotecan.....	5
1.2.3 β GLU de la microbiota del colon.....	6
1.3 Beneficios de los probióticos durante el tratamiento con quimioterapeúticos.....	8
1.4 Herramientas in silico para describir cambios enzimáticos por efecto del pH.....	9
II.HIPÓTESIS.....	10
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	10
IV.OBJETIVOS.....	13
4.1 Objetivo General.....	13
4.2 Objetivos específicos.....	13
V.MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5.1 Diseño del estudio.....	13
5.2 Descripción de las características generales de las β GLU.....	14
5.3 Descarga y visualización de la estructura 3D de las β GLU.....	16
5.4 Modelamiento del dímero β GLU <i>E. eligens</i>	17
5.5 Estimación de cargas a pH óptimo y pH ácido.....	18
5.6 Dinámica molecular a pH óptimo y pH ácido.....	18
5.6.1.Resultados de la dinámica molecular.....	19
5.6.2.Generación del Cluster.....	19
5.6.2.1 Calculo de diferencia de cargas de las β GLU clúster del pH óptimo y ácido.....	22
5.6.3.Control positivo de la dinámica molecular.....	22
5.7 Cálculo del área del bolsillo del sitio activo.....	23
5.8 Potencial electrostático de la zona de homodimerización.....	24
5.9 Energía potencial.....	26
5.10 Cuestiones Éticas.....	30
VI. RESULTADOS.....	30
6.1 Información general sobre las β GLU.....	30
6.2 Estructura 3D de las β GLU.....	32
6.3 Estimación de cargas a pH óptimo y ácido.....	41
6.4 Resultados de la Dinámica Molecular.....	43
6.4.1 Resultados de la β GLU de <i>E. coli</i>	43

6.4.1.1. Diferencias estructurales (RMSD) en la β GLU <i>E. coli</i> a pH 7.4 y 3.....	43
6.4.1.2. Diferencias del RMSF en la β GLU <i>E. coli</i> a pH 7.4 y 3.....	44
6.4.1.3. Diferencias del SASA en la β GLU <i>E. coli</i> a pH 7.4 y 3.....	49
6.4.1.4. Diferencias del Radio de giro de la β GLU <i>E. coli</i> a pH 7.4 y 3.....	49
6.4.1.5. Diferencias en los Enlaces de Hidrógeno de la β GLU <i>E. coli</i> a pH 7.4 y 3.....	50
6.4.2 Resultados de β GLU <i>E. eligens</i>	51
6.4.2.1 Diferencias RMSD de las β GLU <i>E. eligens</i> a pH 6.5 y 3.....	51
6.4.2.2. Diferencias RMSF de las β GLU <i>E. eligens</i> a pH 6.5 y 3.....	52
6.4.2.3. Diferencias del SASA de las β GLU <i>E. eligens</i> a pH 6.5 y 3.....	57
6.4.2.4. Diferencias del Radio de giro de las β GLU <i>E. eligens</i> a pH 6.5 y 3.....	57
6.4.2.5. Diferencia de los enlaces de Hidrógeno de las β GLU <i>E. eligens</i> a pH 6.5 y 3.....	58
6.4.3 Obtención de Clusters.....	60
6.4.3.1. Análisis de las estructuras cluster.....	60
6.4.3.2 Cargas de los residuos cluster.....	67
6.4.4 Comparación RMSD y potencial electrostático del control positivo.....	73
6.5 Predicción de bolsillos de unión.....	76
6.5.1 β GLU de <i>E. coli</i>	76
6.5.2 β GLU de <i>E. eligens</i>	78
6.6 Potencial electrostático de la zona de homodimerización.....	80
6.6.1 β GLU <i>E. coli</i> a pHs 7.4 y 3.....	80
6.6.2 β GLU <i>E. eligens</i> pHs 6.5 y 3.....	83
6.7 Energía potencial.....	85
VII. DISCUSIÓN.....	87
VIII. CONCLUSIONES.....	94
IX. REFERENCIAS	95

RESUMEN

La microbiota intestinal influye en la respuesta inmune y en la toxicidad de quimioterapéuticos como el irinotecán, asociada a la actividad de la β -glucuronidasa (β GLU). Los probióticos, como *Lactobacillus plantarum*, reducen estos efectos adversos mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la modificación del pH intestinal, lo que podría inhibir la β GLU. Sin embargo, el impacto del pH ácido en su estructura y estabilidad no está completamente dilucidado. Mediante simulaciones en computadora aplicando dinámica molecular (WebGro, AMBER99SB-ILDN) y visualización molecular (Pymol, Molsurfer, PorteinPlus), se evaluó el efecto del pH ácido en las β GLU de *E. coli* y *E. eligens*. Los análisis de RMSD, RMSF, Rg y SASA revelaron cambios conformacionales críticos que incluyeron (1) expansión del bolsillo de unión, (2) mayor fluctuación de los residuos en bucles adyacentes al sitio activo, y (3) redistribución de cargas electrostáticas. Estas alteraciones sugieren una menor afinidad por el sustrato a pH ácido. Adicionalmente, la pérdida de enlaces de hidrógeno y el incremento en la energía potencial indicaron un estado estructural inestable en ambas enzimas, compatible con una reducción en su actividad catalítica. Estos resultados no solo proporcionan una comprensión detallada de los mecanismos moleculares mediante los cuales el pH ácido regula la actividad de las β GLU, sino que también abren nuevas vías para futuras investigaciones, como el diseño de inhibidores específicos y el uso de probióticos para modular la actividad enzimática en aplicaciones terapéuticas. En conjunto, este estudio sienta las bases para explorar estrategias que permitan manipular la actividad de estas enzimas en el contexto de enfermedades relacionadas con la microbiota intestinal y la toxicidad asociada a la reactivación de metabolitos

Palabras clave:

Irinotecan, pH, inhibición, bioinformática, beta-glucuronidasa

ABSTRACT

The gut microbiota influences the immune response and the toxicity of chemotherapeutic drugs such as irinotecan, an effect associated with the activity of β -glucuronidase (β GLU). Probiotics, like *Lactobacillus plantarum*, reduce these adverse effects by producing short-chain fatty acids (SCFAs) and modifying the intestinal pH, which could inhibit β GLU. However, the impact of acidic pH on its structure and stability is not fully elucidated. Using computer simulations applying molecular dynamics (WebGro, AMBER99SB-ILDN force field) and molecular visualization (Pymol, Molsurfer, PorteinPlus), the effect of acidic pH on the β GLU enzymes from *E. coli* and *E. eligens* was evaluated. Analyses of RMSD, RMSF, Rg, and SASA revealed critical conformational changes that included (1) expansion of the binding pocket, (2) increased fluctuation of residues in loops adjacent to the active site, and (3) redistribution of electrostatic charges. These alterations suggest a lower substrate affinity at acidic pH. Additionally, the loss of hydrogen bonds and the increase in potential energy indicated an unstable structural state in both enzymes, consistent with a reduction in their catalytic activity. These results not only provide a detailed understanding of the molecular mechanisms by which acidic pH regulates β GLU activity but also open new avenues for future research, such as the design of specific inhibitors and the use of probiotics to modulate enzymatic activity in therapeutic applications. Collectively, this study lays the groundwork for exploring strategies to manipulate the activity of these enzymes in the context of diseases related to the gut microbiota and the toxicity associated with metabolite reactivation.

Keywords:

Irinotecan, pH, inhibition, bioinformatics, beta-glucuronidase

I. INTRODUCCIÓN

1.1. La microbiota humana

1.1.1. Composición de la microbiota

Los seres humanos albergamos millones de microorganismos, que mantienen una relación generalmente mutualista, denominada microbiota [1]. La microbiota humana está compuesta por bacterias, virus, archaeas, hongos, protozoos y levaduras, siendo las bacterias los microorganismos más abundantes [2]. El equilibrio de la microbiota, denominado eubiosis, mantiene la relación mutualista con nuestro cuerpo e indica buena salud, por ejemplo, el microbioma vaginal está representado por *Lactobacillus*, cuya abundancia se asocia con un estado saludable del órgano [1,2].

Las alteraciones del equilibrio de la microbiota, o disbiosis, provocan que ciertas bacterias que solían encontrarse en minoría, incrementen, mientras que otras que predominaban, disminuyan en abundancia, alterando así la diversidad bacteriana. Las causas de la disbiosis son variadas e incluyen la dieta no saludable, el tabaquismo, el consumo de alcohol, la contaminación del aire, el uso de antibióticos, el tiempo de lactancia y la vejez [1-3].

La disbiosis tiene consecuencias significativas que inciden directamente en la salud, desencadenando diversas enfermedades, entre las que se incluyen trastornos inflamatorios como la obesidad, otitis media aguda, rinosinusitis crónica e infección urinaria. Además, la disbiosis crea un microambiente proinflamatorio alrededor de los tumores, lo que no solo favorece la formación de tumores, sino que también contribuye a su progresión; un ejemplo ilustrativo de este fenómeno se observa en el cáncer colorrectal (CCR). Asimismo, la disbiosis se asocia con el impulso de la diabetes tipo 2 [2,3].

1.1.2. Importancia de la microbiota

La microbiota influye en nuestra salud regulando procesos como el metabolismo, la digestión, la respuesta inmune y la homeostasis. Ello es posible mediante algunos mecanismos biológicos como la biotransformación de compuestos, la absorción de los nutrientes, la regulación de genes, la interacción con ciertos receptores, entre otros [3].

La influencia de la microbiota en los procesos biológicos antes mencionados es mediada por la liberación de metabolitos, péptidos (i.e. péptidos antimicrobianos o AMPs) y factores de virulencia que conllevan a una respuesta en el tejido donde habitan estos microorganismos, y en órganos distantes [2,3]. Por ejemplo, *Staphylococcus epidermidis* neutraliza microorganismos invasores como *S. aureus*, asociado al carcinoma de células escamosas, mediante la producción de 6-N-hidroxi amino purina (6-HAP), la cual suprime la síntesis de ADN y de células tumorales, evitando su proliferación [5].

Además de asociarse con un estado de salud, en presencia de una condición patológica, la microbiota influye en nuestro sistema inmune, por ejemplo modulando la eficacia de los tratamientos farmacológicos. Así, se sabe que *Enterococcus hirae* y *Barnesiella intestinihominis* potencian el tratamiento del quimioterapéutico ciclofosfamida, en modelos murinos de cáncer, mediante el aumento de la relación intratumoral CD8/Treg y la infiltración de células T $\gamma\delta$ productoras de IFN- γ [4].

1.2. Tratamiento anticancerígeno con irinotecan y el rol de la β GLU en su metabolismo

1.2.1. Cáncer y tratamiento

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, cobrando la vida de casi 19 millones de personas cada año [6]. Esta enfermedad surge por la acumulación de aberraciones genéticas en genes que regulan la proliferación e invasión, principalmente. Como consecuencia, se desencadena una excesiva división celular sin estímulo y surge resistencia ante señales tanto de inhibición de crecimiento como de estimulación de apoptosis [7]. Si bien al inicio el cáncer se origina en un tejido y permanece un tiempo en su lugar de origen, en etapas avanzadas invade otros tejidos, proceso conocido como metástasis.

Para contrarrestar el crecimiento excesivo del tejido tumoral se emplea quimioterapia (QT), la cual elimina células cancerosas, pero también células sanas. Su poca capacidad de discriminación entre tejido sano y transformado, provoca que la administración oral o intravenosa de QT conduzca a numerosos eventos adversos, como lesiones bucales, pérdida de cabello, diarrea, entre otros. Incluso en casos avanzados de cáncer con

metástasis, donde los tratamientos quimioterapéuticos muestran poca eficacia, el enfoque se torna mayormente paliativo. En este contexto, la exploración de tratamientos que sean tanto eficaces como seguros, minimizando al máximo las reacciones adversas, se convierte en un imperativo para mejorar la calidad de vida de los pacientes [7]. En este sentido, como ya se ha señalado, la microbiota influye en la eficacia y seguridad del tratamiento e influye en la respuesta inmune contra el cáncer (ver sección 1.1.2).

Dentro de los fármacos más comunes en QT anticancerígena están la capecitabina, la ciclofosfamida, el cisplatino, el metotrexato, el paclitaxel, el 5-fluorouracilo y el irinotecan [8-10]. Este último es un derivado de camptotecina (CPT), el cual se usa para el tratamiento del CCR, así como del cáncer pancreático, de ovario y de pulmón. El mecanismo de acción del irinotecan se centra en la inhibición de la topoisomerasa I, la cual se encarga de la relajación de la doble hélice del ADN durante la replicación. Una vez administrado al organismo, el irinotecan se transforma en SN38, su metabolito activo, a través de la enzima carboxilesterasa. La unión de SN38 al ADN y a la topoisomerasa I genera estructuras ternarias estables, las mismas que promueven un daño en el ADN durante la fase S, lo cual desencadena la apoptosis [10].

1.2.2. Toxicidad por irinotecan

La diarrea es uno de los efectos adversos más reconocidos del tratamiento con irinotecan, y se ha identificado que la reactivación del SN-38G por acción de la β GLU microbiana juega un papel clave en el desencadenamiento de este efecto indeseado [10-12]. Este proceso comienza con la eliminación del metabolito activo SN-38 por excreción biliar, donde el SN-38 sufre una glucuronidación mediada por las enzimas glucuronosiltransferasas UGT1A1 y UGT1A7, convirtiéndose en el metabolito inactivo SN-38G. Este último es excretado hacia el lumen intestinal, donde la enzima β GLU, presente en la microbiota intestinal, remueve el ácido glucurónico del SN-38G,

regenerando así el SN-38 activo. Como resultado, la concentración de SN-38 en el lumen intestinal aumenta, alcanzando niveles tóxicos (Figura 1) [10,11].

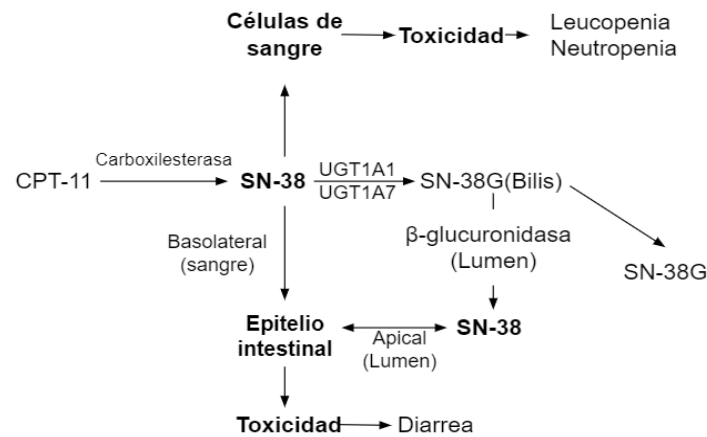


Figura 1. Metabolismo y efectos tóxicos del irinotecan. Imagen tomada de Tukey et al 2002.[11]

Otras razones por las que puede ocurrir toxicidad por irinotecan es por mutaciones de los genes que codifican a las enzimas hepáticas UGT1A1 y UGT1A7, las cuales son responsables del metabolismo del irinotecan. Dichas mutaciones inactivadoras de las enzimas convertidoras provocan la acumulación de SN38, causando diarrea y neutropenia (Figura 1). También la toxicidad por irinotecan se relaciona con transportadores ABC, los cuales están implicados en la salida del irinotecan mediante la bilis y la orina [10,11].

En síntesis, tanto la acumulación del SN38 como la reactivación del SN38-G (que conlleva a conversión a SN38) desencadenan la diarrea por el tratamiento con irinotecan.

1.2.3. βGLU de la microbiota del colon

La βGLU es una hidrolasa ácida que pertenece a la familia de las glicosil hidrolasas. Esta enzima hidroliza un residuo terminal de ácido glucurónico del SN38-G, formando los enlaces O-glicosilo, reacción que ocurre en el lumen intestinal. Su acción catabólica depende de sitios específicos, donde los residuos Glu413 y Glu504 (en *Escherichia coli*) le otorgan a la βGLU la capacidad de catabolizar varios compuestos glucurónicos[11,12]. La βGLU de la microbiota es un reactivador del irinotecan, como se aprecia en la Figura 1, donde el SN38-G es hidrolizado por la βGLU bacteriana convirtiéndolo nuevamente en SN-38, el cual recircula en el intestino y genera la diarrea [10,11].

La β GLU en su forma activa se pliega como un tetrámero, mediante la formación de enlaces disulfuro entre los cuatro monómeros. Esta enzima exhibe tres dominios en cada monómero, donde el primero presenta una estructura en forma de "Jelly roll", mientras que el segundo dominio muestra una geometría idéntica a los dominios constantes de la inmunoglobulina, y el tercer dominio exhibe una estructura de barril TIM α/β . En este tercer dominio es donde se localiza el sitio catalítico. En estos sitios, encontramos residuos ácidos catalíticos que actúan como donantes de protones, así como residuos nucleófilos catalíticos que desempeñan funciones estabilizadoras. El número del residuo varía según la especie, por ejemplo, en los seres humanos los residuos catalíticos de la β GLU son Glu451 y Glu540, mientras que en la β GLU *Escherichia coli* son los residuos Glu413 y Glu504, los cuales desempeñan un papel crucial en la acción catalítica de la enzima [12].

Así mismo, la β GLU contiene dos loops, el loop 1 (L1) que contiene unos 15 residuos y el loop 2 (L2) que contiene unos 12 residuos, localizados en la región variable (Figura 2). De otro lado, la enzima posee una región conservada donde se ubica el sitio de activo, incluyendo los residuos de Glu450 y Glu451 [12]. Precisamente estos residuos y aquellos en los pliegues de hidrolasa α/β son muy conservados entre las β GLU de la microbiota [13].

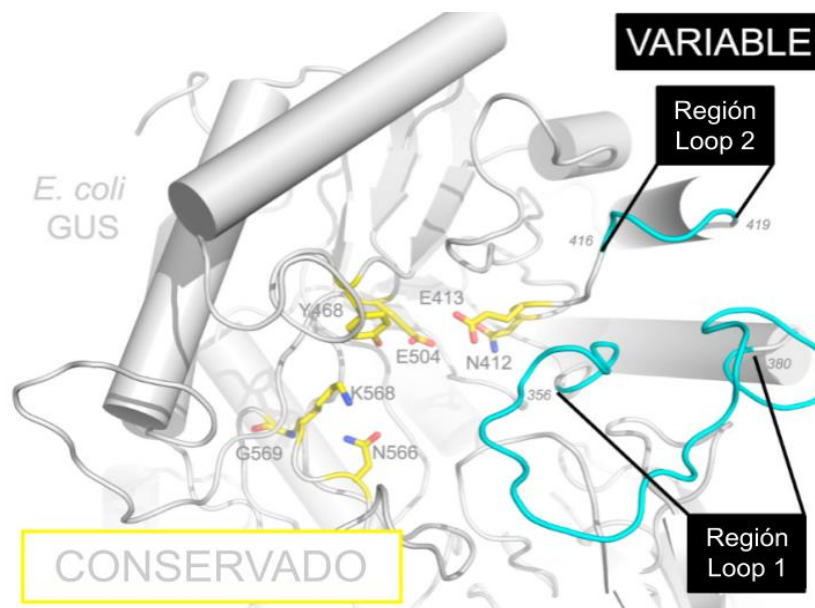


Figura 2. Estructura 3D de la β GLU de *E. coli* mostrando las regiones conservadas y variables así como los residuos que conforman el sitio catalítico. Imagen adaptada de Pollet et al (2017)[13].

Considerando las variaciones de la estructura por especie y su tamaño, existen diferentes categorías de estructura de la β GLU como Loop 1, mini-Loop 1, L2, mini-Loop 2, mini-loop L1, L2 y NoLoop (sin loop), principalmente. El bucle Loop1 se considera completo por presentar más de 15 residuos mientras que el mini-loop 1 es más pequeño, presentando de 10 a 15 residuos. El bucle completo L2 presenta más de 12 residuos, mientras que el mini-loop 2 presenta de 9 a 11 residuos [13].

Así mismo, no todas las β GLUs microbianas participan en la reactivación del irinotecan, sin embargo, la β GLU de tipo L1 de *Eubacterium eligens*, una bacteria de la microbiota intestinal, se ha confirmado que sí está asociada a la reactivación de irinotecan *in vitro* y *ex vivo* [13,14]. En cuanto a la función y actividad de la β GLU en la reactivación del irinotecan, dichas propiedades son determinadas por la estructura de la enzima, la cual a su vez depende del pH del medio. El pH óptimo de la β GLU varía desde 4 a 7.4, dependiendo de la bacteria que la produce [13]. Puntualmente, la β GLU *E. eligens*, la cual sería una de las principales en reactivar el SN38, realiza su catálisis a pH de 6 y 6.5 [13]. Por su parte, la β GLU de *E. coli* tiene una catálisis óptima a pH 7.4. Por lo tanto, queda claro que la variación del pH del medio influye en las tasas de recambio catalítico de las β GLU microbianas.

1.3. Beneficios de los probióticos durante el tratamiento con QT

Los probióticos son microorganismos vivos, siendo los más comunes *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. La colonización de estas bacterias beneficia nuestra salud, mejorando la inmunidad y la acción protectora del intestino [15]. Por ejemplo, la administración oral de probióticos mejora el perfil de seguridad de la quimioterapia, reduciendo, entre otros efectos, la incidencia de diarrea severa inducida por el 5-FU [11,16].

Así, los probióticos ofrecen una nueva alternativa para aliviar los efectos secundarios gastrointestinales del tratamiento con irinotecan, un fármaco anticancerígeno. Específicamente, en el caso de la diarrea causada por irinotecan, se ha observado que la inhibición o reducción de la actividad de la β GLU de la microbiota intestinal contribuye a disminuir la toxicidad del fármaco y, como resultado, detiene la aparición de la diarrea

[12]. Por lo tanto, la búsqueda de inhibidores o condiciones para atenuar la actividad de la β GLU es un punto clave.

Puntualmente, en el estudio de Ningegowda (2012), se demostró que la actividad de la β GLU de *E. coli* disminuye al exponerla a los ácidos grasos de cadena simple (SCFAs) producidos por el probiótico *Lactobacillus plantarum* CFR 2194. Dichos SCFAs incluían ácido láctico, ácido butírico, ácido fórmico y etanol. En dicho estudio se propuso que la reducción del pH por dichos SCFAs (metabolitos ácidos) provocaba la atenuación de la función de la β GLU, lo que resultaría en una disminución de la toxicidad gastrointestinal y, por ende, aplicaría la diarrea asociada al tratamiento con irinotecan [17].

1.4 Herramientas in silico para describir cambios enzimáticos por efecto del pH

El constante desarrollo y búsqueda de nuevos tratamientos, medicamentos y productos para mejorar los procesos de tratamiento son cruciales en la medicina actual. La integración de la tecnología, especialmente en disciplinas como la biología computacional y la dinámica molecular (DM), ejemplifica la importancia de avanzar en la comprensión de la ciencia y los tratamientos. Un caso destacado es el estudio de cómo el cambio en el pH afecta la conformación de la anhidrasa carbónica mitocondrial VA. Este análisis resulta fundamental para comprender el papel crucial de esta enzima en procesos metabólicos vitales, dado su vínculo con diversas enfermedades como diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares [18].

La comprensión de la actividad enzimática es vital para el ecosistema, como en el caso de las betaglicosidasas, que desempeñan un papel crucial en el recambio de carbono. El estudio de su conformación dependiente del pH revela cómo este factor influye en su unión al sustrato y la participación de residuos catalíticos [19]. Identificar residuos críticos en proteínas es esencial para desarrollar estrategias contra enfermedades o para aplicaciones industriales, como se evidencia en el estudio de la penicilina acilasa. Evaluar su estabilidad a pH básico y mutar residuos críticos mejoró su estabilidad, siendo esta enzima ampliamente utilizada en biocatalizadores y preparación de enantiómeros [20].

En el ámbito de las enfermedades, el estudio de la proteasa del coronavirus-2 destaca por revelar cómo su actividad y dimerización dependen del pH, identificando residuos implicados en la estabilidad del dímero a pH ácido. Estos hallazgos son fundamentales para el diseño racional de fármacos y la evaluación de objetivos contra el COVID-19 [21].

II. HIPÓTESIS

Considerando la evidencia expuesta en la sección anterior, en este trabajo se planteó las siguientes hipótesis:

- La inhibición de la β GLU de *E. coli*, por acción de los SCFAs producidos por probióticos, ocurre por un cambio en la estabilidad y en la estructura del dímero de la enzima, ocasionado por un bajo pH.
- Además, dado que la β GLU de *E. eligens* es la principal enzima reactivadora de SN38-G en el intestino, hipotetizamos que una disminución del pH también inhibe su función y afecta su estabilidad y estructura, tal como sucede en *E. coli*.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La microbiota tiene un papel fundamental en nuestra salud y en la forma en que respondemos a un tratamiento, incluida la QT anticancerígena (QT-AC). Esta última contiene compuestos tóxicos y los pacientes que los reciben sufren de diversos efectos adversos, incluida la diarrea. La aparición de síntomas asociados con la QT-AC no es un problema menor, ya que los pacientes con cáncer pueden presentar desapego al tratamiento debido a la toxicidad percibida, lo cual puede reducir su efectividad. Estos eventos pueden conducir a desarrollar quimio resistencia temprana debido a la administración irregular o abandono del fármaco, antes de completar el ciclo de tratamiento.

En este sentido, resulta importante contar con medidas que reduzcan la sintomatología asociada con la QT-AC. Por ejemplo, el uso de antieméticos durante la QT-AC ayuda a reducir las náuseas causadas por fármacos como ciclofosfamida, cisplatino, fluorouracilo, usados comúnmente en la QT-AC. Así mismo, la administración de enjuagues bucales que contienen protectores de la mucosa bucal, como la clorhexidina, contribuyen a evitar

la aparición de llagas en la cavidad oral [22]. Por otro lado, para contrarrestar la diarrea por QT-AC, se administran ciertos fármacos como la loperamida, sin embargo, a altas dosis, este fármaco puede ocasionar cardiopatías [23]. De hecho, el uso frecuente de antidiarreicos puede conllevar a constipación intestinal, lo cual se suma a la larga lista de síntomas que el paciente con cáncer tiene que padecer.

El alivio de la diarrea no es una medida menor, al contrario, es una prioridad durante el tratamiento anticancerígeno, ya que la pérdida de fluidos y sales puede complicar la condición de salud de los pacientes. Además, la diarrea es un evento muy frecuente asociado con la QT-AC, presentándose en el 50-80% de pacientes que reciben dichos fármacos anticancerígenos [24]. Por ello, existe una necesidad inminente de encontrar nuevas alternativas que ayuden a prevenir o reducir la diarrea ocasionada por la QT-AC.

Puntualmente, el irinotecan, uno de los quimioterapéuticos más usados en el tratamiento de varios tipos de cánceres sólidos, ocasiona eventos de diarrea muy frecuentes. La diarrea asociada con irinotecan surge debido a la acción de la enzima β GLU de la microbiota intestinal. Esta enzima reactiva el complejo inactivo SN38-G (listo para excretar) y forma SN38, el metabolito activo de irinotecan, que en abundancia, causa la diarrea. Por lo tanto, ya que la toxicidad del irinotecan se debe a la acción de la β GLU de la microbiota, la inhibición de esta enzima representa una estrategia para reducir o evitar la diarrea asociada con irinotecan.

La presencia de esta enzima en el intestino no es menor. De hecho, se sabe que el 43% de las bacterias de la microbiota son productoras de la β GLU. Por ello, hay mucho interés en torno a esta enzima, habiéndose descubierto varios inhibidores de su actividad que han ayudado a mejorar el perfil de seguridad de la QT-AC basada en irinotecan [12]. Si bien estos inhibidores reducen la actividad de la enzima, nuevamente, pueden conllevar a otros síntomas asociados, algo indeseable para los pacientes con cáncer que reciben QT-AC. Por ello, una buena alternativa sería modular la actividad de la β GLU empleando otras estrategias, no farmacológicas, por ejemplo, con probióticos.

Los probióticos, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, tienen varios efectos positivos sobre la salud. Por ejemplo, estos microorganismos refuerzan la barrera de la mucosa

intestinal cuando surge la disbiosis [15]. Los probióticos también tienen efecto sobre la β GLU de *E. coli*, inactivando su función *in vitro*. Este hecho ha sido asociado con la acción de ciertos metabolitos y productos de fermentación, principalmente SCFAs como el ácido láctico. Se postula que dicho efecto inhibitorio de la β GLU tenga su explicación en un cambio de pH del medio ocasionado por los SCFAs. Por lo que en esta tesis se propuso determinar, a través de métodos *in silico*, si hay un efecto directo en la estructura y la estabilidad de la β GLU ante la disminución del pH, que pudiera explicar su inhibición por acción de los probióticos.

Por otro lado, no todas las β GLU de la microbiota son responsables de la reactivación del SN38. En el estudio de Jariwala (2020) se asoció la actividad de la β GLU de *E. eligens* con la reactivación del SN38, lo cual sugiere que esta enzima se vincula con la toxicidad de la molécula y los eventos de diarrea. No se sabe si los probióticos afectan la actividad de la β GLU de *E. eligens*, pero considerando la evidencia previa de Nungegowda (2012) y los metabolitos de fermentación como los SCFAs, es posible que dichos compuestos también ejerzan un efecto en la β GLU de *E. eligens*

Por otro lado, estudios recientes han establecido que cepas probióticas como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum* pueden generar microambientes extremadamente ácidos (pH 3.94-3.99) en solo 24 horas mediante la producción de ácido láctico y otros metabolitos orgánicos. Esta acidificación, cercana al pKa del ácido láctico (3.86), es particularmente relevante en el contexto del colon proximal, donde la interacción entre probióticos y enzimas bacterianas como la β GLU podría afectar significativamente la activación de compuestos como el SN38 [25]. Considerando estos antecedentes, en este estudio nos propusimos evaluar cómo un pH ácido de 3.0 podría afectar la estructura y estabilidad de la β GLU de *E. eligens* mediante simulaciones de DM.

Conocer el mecanismo mediante el cual el pH modula la acción de la β GLU es importante para el diseño y desarrollo de estrategias de inhibición de esta enzima, basados en cambios conformacionales y de estabilidad de la enzima, a pH ácido, por efecto de probióticos u otros medios. Dichas estrategias podrían producir una nueva generación de inhibidores de β GLU que favorezcan la calidad de vida de los pacientes con cáncer que reciben QT-

AC, reduciendo o desapareciendo los eventos de diarrea y ayudando así a mejorar su calidad de vida.

Por lo expuesto antes, la pregunta formulada en la presente tesis fue ¿Qué efecto tiene la disminución del pH sobre la estructura y estabilidad del dímero de la β GLU de *E. coli* y la β GLU de *E. eligens*?

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Predecir mediante simulaciones de dinámica molecular el cambio de estructura y estabilidad de la β GLU de *E. coli* y de *E. eligens* ocasionado por una disminución del pH

4.2. Objetivos específicos.

- Determinar el cambio conformacional de las β GLU a pH ácido.
- Estimar los cambios de las interacciones intermoleculares en los dímeros de las β GLU a pH ácido.
- Comparar la estabilidad energética de las β GLU en condiciones de pH ácido.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño del estudio

Este estudio in silico de visualización molecular y simulaciones computacionales tuvo un enfoque retrospectivo, ya que se basó en datos preexistentes disponibles en bases de datos públicas y literatura especializada. Mediante herramientas computacionales, evaluamos los cambios estructurales en nuestras enzimas, un proceso detallado en la Figura 3. Todos los recursos bioinformáticos utilizados se enumeran sistemáticamente en la Tabla 1.

Tabla 1. Recursos bioinformáticos consultados

Recurso	Link	Utilidad
Brenda	https://www.brenda-enzymes.org/	Información sobre enzimas y vías metabólicas.
CATHD	https://www.cathdb.info/	Información de estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos.
eF-surf	https://pdj.org/eF-surf/top.do	Herramienta para analizar y visualizar la superficie de proteínas y ácidos nucleicos.
Fpocket	https://durrantlab.pitt.edu/fpocketweb/	Herramienta para identificar sitios de unión en proteínas.
Galaxy Web	https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=	Herramienta para predicción de estructuras de proteínas, refinamiento y métodos relacionados.
Molsurfer	https://molsurfer.h-its.org/	Herramienta para estudiar las interfaces proteína-proteína y proteína-ADN/ARN.
PDBePISA	https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/	Herramienta para analizar la interacción entre proteínas y otras moléculas.
PDBsum	http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html	Información sobre la estructura tridimensional de proteínas.
Playmolecule	https://playmolecule.com/proteinPrepare/	Herramienta para realizar simulaciones de dinámica molecular y visualizar moléculas en 3D.
Protein Data Bank	https://www.rcsb.org/	Información de estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos.
ProteinPlus	https://proteins.plus/	Herramienta para analizar interacciones proteína-ligando.
Protparam	https://web.expasy.org/protparam/	Herramienta para calcular diferentes propiedades físico-químicas de una secuencia de proteínas.
Pymol	https://pymol.org/2/	Software de visualización molecular que permite crear y manipular modelos 3D de moléculas.
Uniprot	https://www.uniprot.org/blast/	Información sobre proteínas
Webgro	https://simlab.uams.edu/ProteinInWater/index.html	Herramienta para realizar simulaciones de DM

5.2. Descripción de las características generales de las β GLU

En la primera etapa, consultamos el Protein Data Bank (PDB), Uniprot y Brenda para obtener información general sobre las β GLU de *E. eligens* y *E. coli*. Para ello, ingresamos los términos “beta glucuronidase *E. coli*”, “beta glucuronidase *E. eligens*” y “beta glucuronidase” en los recursos mencionados. Los códigos Uniprot asignados a las proteínas de interés, fueron obtenidos de la información proporcionada en las respectivas entradas PDB de ambas enzimas. Se obtuvo la secuencia y el tamaño del monómero de Uniprot.

Además, se introdujeron las secuencias de β GLU de *E. eligens* (C4Z6Z2) y β GLU de *E. coli* (P05804) en el programa Protparam para determinar el índice de inestabilidad, índice alifático, punto isoeléctrico y el porcentaje de residuos con carga positiva y negativa. Cabe destacar que el cálculo manual del porcentaje de estos residuos se realizó dividiendo su número total entre el número de residuos (monómero) y multiplicando por 100%. Protparam proporcionó información específica sobre los residuos con carga positiva y negativa.

Para identificar el tipo de plegamiento, introdujimos los códigos PDB de las β GLU estudiadas, 3K46 para β GLU de *E. coli* y 6BJW para β GLU de *E. eligens*, en la base de datos de Clasificación de Estructura de Proteínas, CATHD. Optamos por "Matching PDB structures" y luego en la categoría "CATHD domains". Los resultados recopilados se encontraron en la sección "CATHD Classifications". Dado que código PDB 6BJW de la β GLU de *E. eligens* no arrojó resultados en CATHD, se utilizó el Uniprot ID de la secuencia de β GLU de *E. eligens* (C4Z6Z2) obtenido de Uniprot. Luego seguimos los mismos pasos para determinar el tipo de plegamiento de la β GLU de *E. coli*.

La identificación de los dominios se llevó a cabo a través de la base de datos PDBsum, donde se ingresaron los códigos PDB de β GLU de *E. coli* y *E. eligens*. Los detalles de los dominios se hallaron en la sección "Domain" de la base de datos Pfam, ubicada dentro de la categoría "Protein" en PDBsum.

Se recabó información sobre los residuos en el sitio activo a partir de artículos científicos. Para la β GLU de *E. coli*, se utilizó el artículo donde se reveló su estructura 3D por difracción de rayos-X y otro artículo [26,27]. Así mismo, para la β GLU de *E. eligens*, se obtuvo información del artículo donde se resolvió su estructura 3D por difracción de rayos-X [27]. Así mismo, el pH óptimo de ambas enzimas fue obtenido del estudio de Pollet et al. (2017).

Para identificar los sustratos de estas enzimas, se empleó la base de datos Brenda. Se ingresó la palabra clave "betaglucuronidase" y se seleccionaron las especies *Escherichia coli* y *Lachnospira eligens* en la categoría "Select one or more organisms in this record".

Los sustratos fueron localizados bajo la sección "substrate". Cabe mencionar que *Lachnospira eligens* se refiere a la reclasificación del nombre de *Eubacterium eligens*.

Después de recopilar toda esta información se generó una matriz, en el programa Excel, con los datos recolectados.

5.3 Descarga y visualización de la estructura 3D de las β GLU.

Se consultó el PDB para buscar las estructuras de las β GLU de *E. eligens* y de *E. coli*, ingresando los términos "beta glucuronidase E. coli", "beta glucuronidase E. eligens" y "beta glucuronidase". Se eligieron las estructuras 3D de interés las cuales se procedieron a descargar, escogiendo, de preferencia, las estructuras β GLU no acomplejadas con ligandos o inhibidores (formas apo). Los códigos PDB de las estructuras descargadas fueron 6BJW (β GLU *E. eligens*) y 3K46 (β GLU *E. coli*).

Posteriormente, la visualización se realizó con el programa PyMOL e incluyó la inspección de su estructura 3D global y el reconocimiento del sitio activo y residuos catalíticos. Para comparar la conformación estructural de los residuos activos de las dos β GLU, se cargaron en Pymol los dos archivos pdb correspondientes y se utilizó el comando "Align" bajo la opción de "action", calculando el RMSD (Raíz Cuadrada de la Media de los Cuadrados de las Desviaciones) para determinar la similitud entre ambas estructuras.

Para comparar la topología y tamaño del sitio activo de ambas enzimas, primero se predijeron los sitios de unión, insertando los códigos pdb 6BJW (β GLU *E. eligens*) y 3K46 (β GLU *E. coli*) en el recurso bioinformático Protein-plus. Para ello, se usó la herramienta de DogSiteScorer, que es un método basado en cuadrícula para detectar sitios de unión. Dentro de las variables del algoritmo, se corrió la función de "Pocket" y se indicó estimar sus propiedades en la opción "Granularidad de predicción del sitio de enlace". Los potenciales sitios de unión resultantes en el sitio activo de ambas enzimas se visualizaron en tiempo real y se guardaron las imágenes para comparar la diferencia de tamaño de los sitios activos entre estas especies.

También se computó la superficie electrostática de las estructuras usando el programa PyMOL, aplicando las siguientes opciones de la barra de tareas: “action” → “generate” → “vacuum electrostatics” → “protein contact potential (local)”. Las imágenes generadas mediante Pymol resultaron esenciales para comprender la distribución de las cargas eléctricas positivas y negativas del potencial electrostático en las enzimas.

Finalmente, se determinaron las interacciones formadas en las zonas de homodimerización de ambas enzimas, por separado. Para ello, se introdujo el código pdb 3K46 (β GLU *E. coli*) en el recurso PDBSum y se seleccionó la opción “prot-prot” para identificar las interacciones en las zonas de homodimerización. En el caso de la β GLU *E. eligens*, se introdujo el código 6BJW (β GLU *E. eligens*) en la herramienta web PDBePISA y activamos las funciones "interface" y "details". Hubo necesidad de usar dos programas diferentes debido a que PDBsum no proporcionó información específica sobre los enlaces "prot-prot" de la β GLU *E. eligens*. Finalmente, estos resultados fueron registrados en una matriz de Excel, donde se incluyeron los enlaces que involucraban residuos con carga positiva o negativa. Se priorizó la identificación de enlaces relevantes para la estabilidad del dímero de la β GLU en esta área como los puentes salinos y de hidrógeno.

5.4 Modelamiento del dímero β GLU *E. eligens*

Se modeló el dímero de la β GLU de *E. eligens* debido a que no se disponía de dicha estructura en el PDB. Para empezar, se ingresó el archivo pdb del monómero de β GLU de *E. eligens* (código PDB 6BJW) en el servidor web GalaxyWeb, el cual nos ofreció modelados de dímeros basados de estructuras semejantes al pdb que introducimos. Luego de insertamos en los parámetros de “oligomeric state” el valor de 2 y corrimos el modelamiento. Finalmente descargamos, en formato pdb, el Modelo 1 como el dímero β GLU *E. eligens*, el cual presentó los mayores valores de identidad de secuencia y similitud de estructura comparado con las regiones de las proteínas conocidas que tengan una estructura similar de la proteína objetivo.

5.5 Estimación de cargas a pH óptimo y pH ácido

Los dímeros de las β GLU de *E. coli* y de *E. eligens* se ingresaron a la herramienta Playmolecule en el módulo “Proteinprepare” para evaluar el estado de las cargas, tanto al pH óptimo (de cada una) como a pH ácido. Así, se computaron las cargas de la β GLU de *E. coli* a pH 7.4 (óptimo) y a pH 3 (ácido) mientras que se hizo lo mismo con la β GLU de *E. eligens* a pH 6.5 (óptimo) y a pH 3 (ácido). Para empezar, se introdujo el archivo pdb de los dímeros, luego se seleccionó el pH deseado, se retiró las moléculas de agua de la estructura y luego se corrió el programa en Playmolecule. Finalizado el cómputo de cargas, se descargaron los resultados en archivos .pdb tanto para la β GLU de *E. coli* (a pH 7.4 y 3) como para la β GLU de *E. Eligens* (a pH 6.5 y 3).

La evaluación del cambio de cargas se observó mediante el cambio del potencial electrostático de las enzimas. Para ello, los archivos .pdb de Playmolecule (cargas estimadas por pH óptimo y ácido) se ingresaron individualmente al servidor web eF-surf para representar las superficies moleculares y el potencial electrostático de las β GLU, los cuales se descargaron en un archivo “PyMOL CGO file”. Finalmente, en PyMOL se cargaron los archivos “PyMOL CGO file” de cada enzima, al pH óptimo y pH ácido, para realizar una comparación visual de la distribución de cargas positivas y negativas del potencial electrostático.

5.6 Dinámica molecular a pH óptimo y pH ácido

Para correr las rutinas de dinámica molecular (DM), se ingresó los ficheros .pdb de las β GLU de *E. coli* (a pH 7.4 y 3) y de *E. eligens* (a pH 6.5 y 3) en el servidor WebGro, eligiendo la opción el “Protein in Water Solution” de las herramientas en línea. Los parámetros escogidos fueron:

- Campo de fuerza: AMBER99SB-ILDN
- el modelo de agua: SPC
- el tipo de caja: cúbico
- el tipo de sal: NaCl.

La DM se realizó a 300 K, con la presión de 1 Bar y el tiempo de simulación fue 50 ns.

5.6.1. Resultados de la dinámica molecular

Los resultados se descargaron desde un link ofrecido por WebGro como un archivo comprimido, recibido por email. Se obtuvo como resultados el RMSD (Desviación Cuadrática Media) de la estructura a lo largo del tiempo de simulación (comparada con la estructura inicial), el RMSF (Root Mean Square Fluctuation) de cada residuo en la estructura dada, el Rg (Radio de Giro o compactación estructural), el SASA (Área Superficial Accesible al Solvente.) y enlaces de hidrógeno (Número promedio de enlaces de hidrógeno en cada estructura a lo largo del tiempo). También se obtuvo un archivo pdb con todos los frames de los de 50 ns de la DM. Todos estos resultados se analizaron y compararon.

5.6.2 Generación del Cluster

A lo largo de la DM, se observaron diversas representaciones de la posición de la estructura de la β GLU de *E. coli* y *E. eligens* a pH óptimo y ácido. Con el propósito de generar una estructura representativa de las β GLU de *E. coli* y *E. eligens*, tanto a pH óptimo como a pH ácido, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento mediante el programa GROMACS.

Para determinar la estructura representativa, fue necesario establecer desde qué nanosegundo de la dinámica molecular debía considerarse el inicio del análisis de clústeres. Esta decisión se basó en la evaluación de los valores de RMSD y radio de giro (Rg) a lo largo del tiempo, con el objetivo de identificar el intervalo en el que la proteína alcanzaba una mayor estabilidad estructural, es decir, sin fluctuaciones significativas. Una vez definido este punto, se procedió a determinar un valor de umbral (cutoff) apropiado para la formación de clústeres, el cual se seleccionó tras realizar agrupamientos con diferentes valores de cutoff, basados en los rangos de RMSD observados para cada β -glucuronidasa (β GLU) durante las simulaciones. El procedimiento se llevó a cabo utilizando tres archivos de entrada: (i) la trayectoria completa de dinámica molecular de la β GLU de *E. coli* a pH 7.4 en formato PDB ('allframes_ecoli_74.pdb'), obtenida en la sección 5.6.1; (ii) la estructura preparada de la enzima a su respectivo pH (ácido u óptimo), obtenida desde la plataforma PlayMolecule y guardada como 'pre_ecoli74.pdb' (sección 5.5); y (iii) el archivo de topología correspondiente.

En el caso específico de la β GLU de *E. coli* a pH 7.4 y pH 3, se exploró un rango de cutoff de 0.10-0.40 nm, con incrementos de 0.05 nm. Para la β GLU de *E. eligens*, tanto a pH 6.5 como a pH 3, se evaluó un rango ligeramente más amplio, de 0.10-0.45 nm, con los mismos incrementos. En todos los casos, si durante el análisis se detectaba un cambio abrupto en el número de clústeres, por ejemplo, pasando de varios grupos grandes a un único grupo dominante, se refinó la búsqueda utilizando incrementos más pequeños de 0.01 nm para identificar un punto de corte más preciso.

El criterio para seleccionar el cutoff óptimo consideró adecuado el menor valor de cutoff que aún generara un grupo con más del 50% de las conformaciones, con el fin de definir agrupaciones significativas y representativas del espacio conformacional.

La ejecución del análisis de agrupamiento se realizó mediante el siguiente comando en GROMACS:

```
gmx cluster -f allframes_ecoli_74.pdb -s pre_ecoli74.pdb -g cluster_ecoli74.log -method gromos -cutoff 0. -b 30 -tu ns
```

Donde:

-f allframes_ecoli_74.pdb: Especifica el archivo de entrada que contiene todas las estructuras a ser agrupadas (formato PDB).

-s pre_ecoli74.pdb: Indica el archivo de entrada que contiene la información de la estructura y la topología del sistema (formato PDB).

-g cluster_ecoli74.log: Define el nombre del archivo de salida que contendrá la información del clúster.

-method gromos: Selecciona el método de agrupamiento, en este caso, se utiliza el método GROMOS.

-cutoff 0.1: Establece el umbral de corte para la formación de clústeres.

-b 30: Descarta las primeras 30 unidades de tiempo (en este caso, nanosegundos) de la trayectoria para el análisis.

-tu ns: Especifica la unidad de tiempo como nanosegundos.

Luego de insertar el comando con el cutoff adecuado, se seleccionó el análisis en el backbone solamente, no se consideró hidrógenos debido a las variaciones significativas de dichos átomos durante la DM. El análisis del cluster se enfocó en el backbone de los

frames. Al ejecutar este comando, el programa GROMACS generó los resultados del cluster de la DM en el archivo especificado en `-g`, en este caso, denominado "cluster_ecoli74.log". Este archivo .log indicó en qué ns de la DM se encuentra la estructura representativa. Posteriormente, se registró esta información para extraer el cluster en formato .pdb. Para la extracción del cluster en pdb, se utilizaron dos archivos de entrada. El primer archivo contenía toda la DM en formato .pdb (obtenido en la sección 5.61), designado como "allframes_ecoli_74.pdb" en el caso de la β GLU *E. coli* a pH 7.4. El segundo archivo contenía información crucial sobre la configuración de la simulación en formato .tpr (obtenido en la sección 5.61), en el caso de la β GLU *E. coli* a pH 7.4: "mdsim_ecoli74.tpr". La ejecución de la extracción del cluster se llevó a cabo mediante el siguiente comando:

```
gmx trjconv -f allframes_ecoli_74.pdb -s mdsim_ecoli74.tpr -o cluster_ecoli74.pdb -dump 35.9 -tu ns
```

Donde:

-f allframes_ecoli_74.pdb: Especifica el archivo de entrada que contiene la trayectoria completa (formato PDB).

-s mdsim_ecoli74.tpr: Indica el archivo de entrada que contiene la información de la estructura y la topología del sistema (formato TPR).

-o cluster_ecoli74.pdb: Define el nombre del archivo de salida que contendrá la estructura del sistema en el tiempo especificado.

-dump 35.9 : Indica el tiempo específico (en este caso, 35.9 ns) en el que se extraerá la estructura del sistema.

-tu ns: Especifica la unidad de tiempo como nanosegundos.

Se extrajo el documento cluster basado en toda la proteína con el fin de obtener una representación completa de la dinámica, se seleccionó una proteína específica en un momento determinado. El programa ofrecía varias opciones para la extracción de esta proteína, que incluían la selección de solo los carbonos principales, la totalidad de la proteína y otras alternativas. Se optó por extraer la proteína utilizando la opción que garantiza la extracción completa de la misma.

De esta manera, se extrajeron los clústeres representativos de las β GLU de *E. coli* y *E. eligens* tanto a pH óptimo como a pH ácido. Con el fin de analizar los cambios estructurales inducidos por el pH, se alinearon los clústeres obtenidos en ambas condiciones y se evaluaron las diferencias estructurales del sitio activo mediante el programa Pymol.

5.6.2.1 Calculo de diferencia de cargas de las β GLU clúster del pH óptimo y ácido
Inicialmente, se obtuvieron los archivos PDB de ambas estructuras a sus respectivos pHs (7.4 y 3.0 para *E. coli*; 6.5 y 3.0 para *E. eligens*). Estos archivos se procesaron en la plataforma Atomic Charge Calculator II utilizando el método SQE+qp, que calcula las cargas atómicas considerando los efectos del pH sobre los estados de protonación de los residuos. Los resultados se descargaron en formato PQR, el cual contiene las coordenadas atómicas junto con sus valores de carga calculados.

Posteriormente, se transformaron los archivos PQR a formato Excel mediante un script de conversión personalizado, permitiendo organizar sistemáticamente las cargas por residuo. Para cuantificar las variaciones electrostáticas inducidas por el pH, se realizó una sustracción directa entre las cargas de cada residuo a pH generando así valores de Δq ($\Delta q = q_{\text{pH ácido}} - q_{\text{pH óptimo}}$). Este enfoque permitió identificar residuos con cambios significativos ($\Delta q > |0.005|$), que luego se correlacionaron con su posición estructural en las zonas funcionales clave (sitio activo e interfaz de homodimerización).

Para visualizar los resultados, los residuos se clasificaron en dos grupos: (1) aquellos con cambios mayores a 0.005 (considerados significativos) y (2) residuos con variaciones menores ($\Delta q < 0.005$). Esta clasificación, combinada con el mapeo estructural de las cargas, proporcionó la base para analizar los patrones de perturbación electrostática en ambas β GLU.

5.6.3 Control positivo de la dinámica molecular

Para demostrar la validez del protocolo de DM, se hicieron simulaciones con una enzima (control) que está resuelta tanto a pH neutro como a pH ácido. Para elegir la enzima, se empleó la función de búsqueda avanzada en el PDB, delimitando el tamaño de la proteína entre 400 y 600 residuos, similar al de la β GLU de estudio (600 aa). Además, se estableció

como requisito que el sistema debía adoptar una estructura dimérica, en línea con nuestras simulaciones de dinámica molecular propuestas para las β -glucuronidasas de *E. coli* y *E. eligens*.

Una vez identificada la enzima control (aminotransferasa de aspartato mitocondrial), se procedió a descargar los archivos PDB de las estructuras resueltas por difracción de rayos-X, a pH neutro (7AAT) y a pH ácido (8AAT). La estructura a pH (7AAT) neutro fue sometida a dinámica molecular (DM) a pH 5.1. Posteriormente, se extrajo el cluster representativo de la trayectoria simulada, mientras que la resuelta a pH ácido (8AAT) sirvió como control, para determinar la precisión de la DM, al ser comparada con la estructura obtenida de dicha rutina. Para ello, primero se evaluaron los estados de carga de la enzima (7AAT) simulando un ambiente a pH ácido (5.1), insertando el archivo PDB de la enzima a pH neutro (7AAT) en PlayMolecule y aplicando el protocolo de la sección 5.5. Al finalizar el cómputo, descargamos el archivo PDB resultante, el cual se introdujo en Webgro para la simulación de DM, según se explicó en la sección 5.6.

Una vez finalizada la dinámica molecular en WebGro, generamos el cluster representativo de la trayectoria para obtener la conformación más estable de la enzima durante la simulación. Esta estructura modelada (7AAT) a pH 5.1 se comparó posteriormente en PyMOL con la estructura experimental resuelta (8AAT) a idéntico pH, analizando tanto las diferencias conformacionales mediante cálculo de RMSD como la distribución de cargas electrostáticas en ambas estructuras, con especial énfasis en la conservación de zonas con cargas positivas y negativas entre el modelo computacional y la referencia experimental. Bajos valores de RMSD indican que ambas estructuras son muy similares, demostrando que la rutina de DM es precisa. Mientras que altos valores de RMSD son indicadores de diferencias estructurales, lo cual es producto de una rutina de DM imprecisa.

5.7 Cálculo del área del bolsillo del sitio activo

Para determinar si el cambio de pH afecta el tamaño del sitio activo, se empleó Fpocket. En la sección "Input File" de Fpocket, se cargaron los archivos PDB obtenidos del análisis de clusters en la sección 5.6.3. Luego, se seleccionó "Start FPocketWeb" para cada

enzima y pH en el programa Fpocket. Después de completar el cálculo, se llevó a cabo una evaluación visual y en tiempo real de los resultados, centrándose en el tamaño del bolsillo del sitio activo en relación con los residuos identificados en la sección 5.3. Se registraron el volumen y el área de superficie accesible (SASA) del sitio activo seleccionado.

La ubicación precisa del sitio activo se hizo comparando las estructuras modeladas con las resueltas disponibles en el Protein Data Bank (PDB), tomando aquellas que estaban en complejo con sus sustratos. En el caso de la β GLU *E. coli*, se utilizó el complejo *resuelto* con el ácido glucurónico (código PDB: 3K4D) mientras que para la homóloga de *E. eligens*, se empleó el complejo con el ácido glucurónico (código PDB: 6BJQ).

5.8 Potencial electrostático de la zona de homodimerización

Los archivos PDB obtenidos del análisis de clusters (ver sección 5.6.3) de las β GLU de *E. coli* y su homóloga en *E. eligens*, en condiciones de pH óptimo y ácido, fueron cargados en Molsurfer con el fin de observar el potencial electrostático de la zona de homodimerización. Se usó la opción “File Upload” de Molsurfer, se seleccionaron ambas cadenas del dímero (A y B) para luego correr el programa Molsurfer y comparar la distribución de cargas positivas y negativas en cada dímero (a pH óptimo y ácido). El análisis se enfocó en la interfaz de dimerización, buscando cambios de concentración de cargas en esas zonas.

Para evaluar las cargas electrostáticas en detalle, se accedió a los resultados generados por Molsurfer modificando la dirección URL de la siguiente manera:

- a. Una vez obtenidos los resultados en Molsurfer, se extrajo el URL, el cual tiene un formato similar a este:

<https://molsurfer.h-its.org/requests/6e1f06b3-5926-4d97-a9ca-73d153b721fa/result.html>

- b. Se removió el término result.html, quedando la dirección de la siguiente forma:
<https://molsurfer.h-its.org/requests/6e1f06b3-5926-4d97-a9ca-73d153b721fa/>
- c. Finalmente, se agregó /adstemp/adsiep.interface al final del URL, obteniendo así la dirección completa que nos permitirá observar los resultados en línea.

Esta última dirección obtenida, contiene una tabla en la que las filas representan puntos en la interfaz. Las dos primeras columnas corresponden a las coordenadas x e y, mientras que las demás columnas siguen el orden indicado en el encabezado:

PROPERTY atom-to-atom distance: Distancia entre átomos.

PROPERTY surface-to-surface distance: Distancia entre superficies.

PROPERTY residue hydrophobicity A: Hidrofobicidad del residuo en el lado A.

PROPERTY residue hydrophobicity B: Hidrofobicidad del residuo en el lado B.

PROPERTY atomic hydrophobicity A: Hidrofobicidad del átomo en el lado A.

PROPERTY atomic hydrophobicity B: Hidrofobicidad del átomo en el lado B.

PROPERTY atomic B-factor A: Factor B (movimiento térmico) del átomo en el lado A.

PROPERTY atomic B-factor B: Factor B (movimiento térmico) del átomo en el lado B.

PROPERTY residue hydrophobicity similarity: Similitud en hidrofobicidad entre residuos de los lados A y B.

PROPERTY atomic hydrophobicity similarity: Similitud en hidrofobicidad entre átomos de los lados A y B.

PROPERTY atomic B-factor similarity: Similitud en los factores B entre átomos de los lados A y B.

PROPERTY electrostatic potential similarity: Similitud en el potencial electrostático entre los lados A y B.

PROPERTY electrostatic potential A: Potencial electrostático en el lado A.

PROPERTY electrostatic potential B: Potencial electrostático en el lado B.

De esta manera, se obtuvieron las cargas electrostáticas presentes en la zona de homodimerización de las cadenas A y B de los dímeros de las β GLU de *E. coli* y *E. eligens*, tanto a pH óptimo como ácido. Estas cargas están representadas en las columnas PROPERTY electrostatic potential A (potencial electrostático en el lado A) y PROPERTY electrostatic potential B (potencial electrostático en el lado B).

Una vez obtenidos los datos cuantitativos de la distribución de cargas en los lados A y B de la interfaz de homodimerización, se determinó el porcentaje de residuos con cargas positivas y negativas en cada región. Este análisis permitió evaluar la complementariedad

electrostática entre ambas caras interactuantes, específicamente mediante la cuantificación de cargas opuestas (positivas en un lado versus negativas en el otro).

La identificación de los residuos en el mapa del potencial electrostático se llevó a cabo mediante la ubicación tridimensional (3D) de los mismos. Para ello, se utilizó el programa Molsurfer, el cual permite reconocer los residuos y, simultáneamente, determinar el área de carga asociada a cada uno. Al seleccionar un residuo en el software, este generaba automáticamente su posición exacta en el mapa. Posteriormente, se capturaron imágenes de cada ubicación identificada y se consolidaron en un único mapa, integrando así todos los puntos correspondientes a los residuos analizados.

5.9 Energía potencial

Para determinar la energía potencial de las enzimas a pH óptimo y ácido, se empleó el software GROMACS. Este cálculo se realizó exclusivamente para las β GLUs durante la DM individual de cada una, a pH óptimo y ácido. Iniciamos utilizando los archivos `mdsim_ecoli74.xtc` y `mdsim_ecoli74.tpr`, ambos obtenidos de los resultados de la DM de GROMACS (sección 5.6.1) para cada enzima, al pH correspondiente. Se aplicó el siguiente comando con el propósito de eliminar el agua de la trayectoria:

```
gmx trjconv -f mdsim.xtc -s mdsim.tpr -o mdsim_center.xtc -center -pbc nojump -ur compact
```

Donde:

`-f mdsim_ecoli74.xtc`: Especifica el archivo de entrada que contiene la trayectoria (formato XTC).

`-s mdsim_ecoli74.tpr`: Indica el archivo de entrada que contiene la información de la estructura y la topología del sistema (formato TPR).

`-o mdsim_center_ecoli74.xtc`: Define el nombre del archivo de salida que contendrá la nueva trayectoria centrada.

`-center`: Indica que se deben centrar los átomos en la caja durante la conversión.

`-pbc nojump`: Se refiere al tratamiento de las condiciones de contorno periódicas para evitar saltos en la trayectoria.

`-ur compact`: Especifica la representación compacta de la unidad de celda.

Posteriormente, para convertir el sistema .tpr a proteína .tpr, se utilizó el archivo mdsim_ecoli74.tpr obtenido de los resultados de la DM de GROMACS mediante el siguiente comando:

```
gmx convert-tpr -s mdsim.tpr -or mdsim_center.tpr
```

Donde:

-s mdsim_ecoli74.tpr: Indica el archivo de entrada que contiene la información de la estructura y la topología del sistema (formato TPR).

-o mdsim_center_ecoli74.tpr: Define el nombre del archivo de salida que contendrá la nueva versión del archivo TPR de proteína.

A continuación, se ejecutó nuevamente el archivo .xtc para obtener un nuevo fichero .edr. Se emplearon los archivos de entrada mdsim_center_ecoli74.xtc y mdsim_center_ecoli74.tpr mediante el siguiente comando:

```
gmx mdrun -rerun mdsim_center_ecoli74.xtc -s mdsim_center_ecoli74.tpr
```

Donde:

-rerun mdsim_center.xtc: Indica que se va a volver a ejecutar la simulación utilizando la trayectoria centrada generada anteriormente.

-s mdsim_center.tpr: Especifica el archivo de entrada que contiene la información de la estructura y la topología del sistema (formato TPR)

con este comando obtenemos el archivo ecoli74_ener.edr

Finalmente, para generar la energía potencial de las β GLUs, se utilizó el archivo ecoli74_ener.edr obtenido del comando anterior mediante el siguiente comando:

```
gmx energy -f ecoli74_ener.edr -o potential_protein_ecoli74.xvg
```

Donde:

-f ener.edr: Especifica el archivo de entrada que contiene la información de energía (formato EDR).

-o potential_protein_ecoli74.xvg: Define el nombre del archivo de salida que contendrá los datos de la energía potencial en formato XVG.

El archivo resultante, llamado potential_protein_ecoli74.xvg, contiene la energía potencial. Estos pasos se repitieron para cada enzima en cada pH (óptimo y ácido). Finalmente, se abrió el archivo potential_protein_ecoli74.xvg en QtGrace, representado como gráficas, para observar y comparar la energía potencial de la β GLU durante toda la DM entre un pH óptimo y ácido.

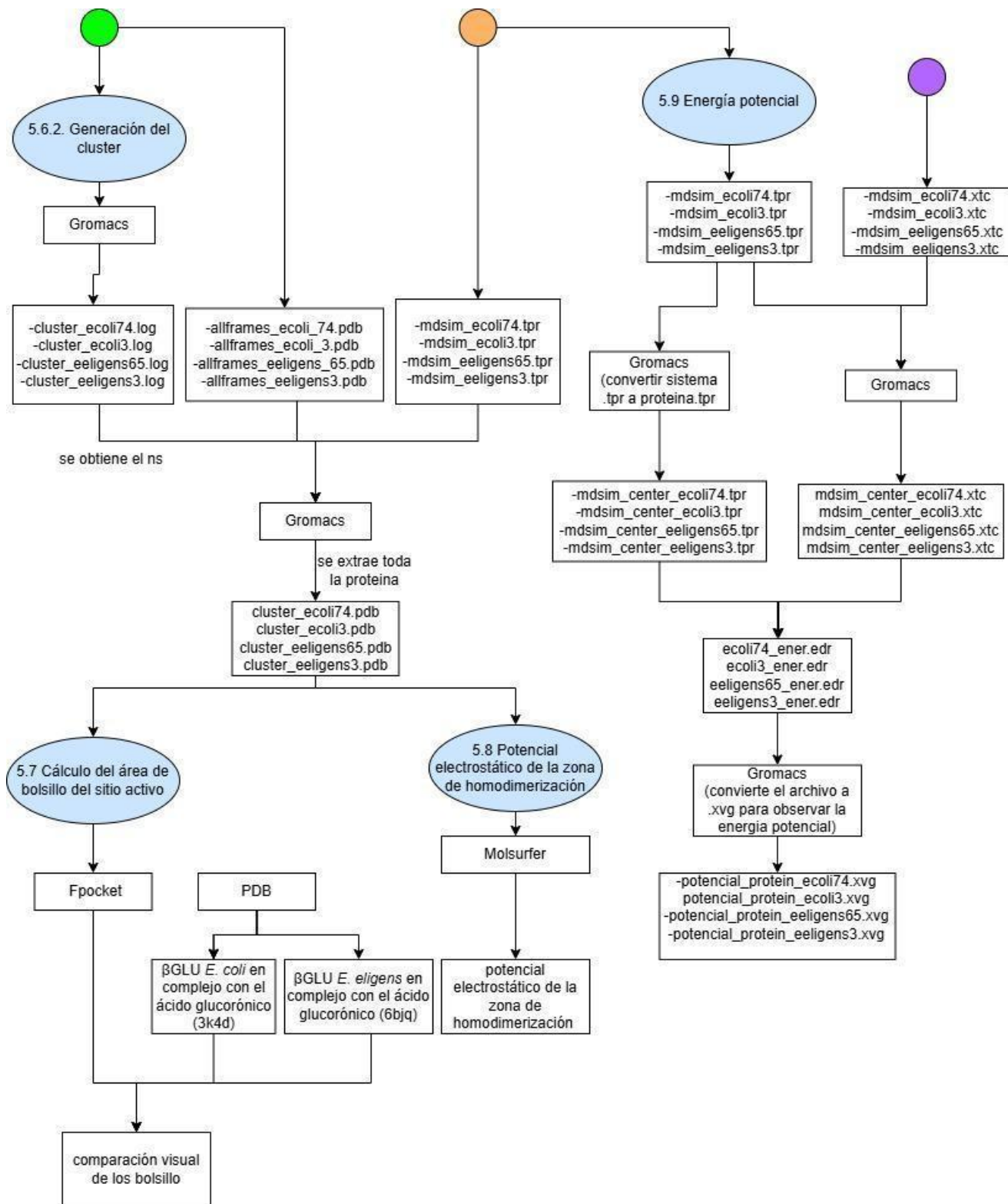


Figura 3B. Segunda parte del flujograma de materiales y métodos

5.10 Cuestiones Éticas

Esta investigación, de naturaleza computacional (*in silico*), registrada en el sistema SIDISI con el código 209140, se basó en el análisis de datos públicos y simulaciones de dinámica molecular, por lo cual fue exonerada de evaluación por un comité de ética institucional el 24 de junio del 2022, conforme a los protocolos vigentes para estudios que no involucran experimentación con seres vivos, muestras biológicas o datos sensibles. No obstante, se aseguró el manejo ético de la información mediante uso responsable de bases de datos públicas, citando fuentes originales y respaldo documental mediante declaración jurada (Formulario F-3), que acredita el cumplimiento de los principios de integridad científica en el ámbito virtual.

VI. RESULTADOS

6.1 Información general de las β GLU

Las secuencias de las β GLU de estudio, C4Z6Z2 (β GLU *E. eligens*) y P05804 (β GLU *E. coli*), fueron descargadas y sus propiedades fisicoquímicas y bioquímicas fueron determinadas consultando herramientas bioinformáticas como Uniprot, PDB y Brenda, así como fuentes literarias (Tabla 2).

Tabla 2. Características de las Beta-glucuronidasas de estudio

Indicador	<i>E. coli</i>	<i>E. eligens</i>	
Tamaño del monómero (en aminoácidos) ^a	605	611	
Propiedades Bioquímicas	Glicosil hidrolasa familia 2, dominio unión de azúcar (1-182)	Glicosil hidrolasa familia 2, dominio unión de azúcar (13-189)	
	Glicosil hidrolasa familia 2 (183-275)	Glicosil hidrolasa familia 2 (191-285)	
	Glicosil hidrolasa familia 2, dominio barril TIM (274-601)	Glicosil hidrolasa familia 2, dominio barril TIM (287-603)	
Residuos del sitio activo ^[25,27]	Asn412, Glu413 , Tyr 468, Tyr469, Tyr472 , Glu504 , Arg562 , Asn566 , Lys568	Asp172, Glu425 , Tyr481, Tyr485 , Phe486, Glu516 , Trp561, Arg574 , Asn578 , Lys580	
pI ^b	5.24	5.03	
pH óptimo ^[13]	7.4	6.5	
Porcentaje de residuos con carga positiva y negativa ^b	22.6	24.9	
Propiedades Fisicoquímicas	Índice de inestabilidad ^b	26.7 estable	33.3 estable
	Índice alifático ^b	77.7	70.8
Sustrato ^e	4-nitrofenil beta-D-glucurónido, beta-D-glucuronósido	4-nitrofenil beta-D-glucurónido, beta-D-galactosa	

*en negrita los residuos equivalentes entre la β GLU *E. coli* y *E. eligens*

a. Protein Data Bank

b. Protparam

c. CATH: Protein Structure Classification Database at UCL

d. PDBsum (Pfam)

e. Brenda

Algunas características fueron similares en ambas enzimas como su tamaño, siendo la β GLU de *E. eligens* ligeramente más grande (611 residuos) que la β GLU de *E. coli* (603 residuos). También presentan dominios idénticos, como el dominio de unión de azúcar, la glicosil hidrolasa familia 2 y el dominio barril TIM. Ambas enzimas comparten uno de sus sustratos, el 4-nitrofenil beta D-glucurónido, aunque difieren en un segundo sustrato específico. En este sentido, la β GLU *E. coli* cataliza la conversión del beta-D-glucurónido, mientras que la β GLU *E. eligens* transforma la beta-D-galactosa. También en el sitio activo, pudimos identificar la presencia de residuos con carga positiva (Arg y Lys) y negativa (Asp y Glu), los cuales estarían involucrados en la actividad nucleofílica catalítica de la β GLU. Es importante destacar que, en ambas enzimas, aproximadamente la mitad de los residuos catalíticos muestran carga eléctrica.

Por el contrario, algunas características fueron diferentes entre ambas homólogas, como el índice de inestabilidad que indica la susceptibilidad de la enzima a la degradación proteolítica. Se observó que la β GLU de *E. eligens* tuvo un valor más alto de esta variable (33.3) que la β GLU de *E. coli* (26.7). Esto sugiere que la β GLU de *E. eligens* es más propensa a la degradación en su entorno biológico. No obstante, ambas enzimas se consideran estables debido a sus bajos valores de índice de inestabilidad. En relación al índice alifático, que refleja la hidrofobicidad de la proteína, la β GLU de *E. coli* exhibe mayor hidrofobicidad o más áreas hidrofóbicas en su estructura que la β GLU de *E. eligens*. Así mismo, la β GLU *E. coli* presenta un pI ligeramente mayor que la homóloga en *E. eligens*, indicando una carga neta más positiva en condiciones neutras. Por su parte, la β GLU *E. coli* tiene un pH óptimo de 7.4 y menos residuos cargados que la β GLU *E. eligens*, cuyo pH óptimo es de 6.5.

6.2 Estructura 3D de las β GLU

Las β GLU resueltas por difracción de rayos X estuvieron disponibles en el PDB y se observó que se encuentran en forma de apoproteína (sin ligando) [26,28]. La visualización molecular de las enzimas, con el programa PyMOL, permitió reconocer el sitio activo (Figura 4A y 5A) y los residuos catalíticos (Figura 4B y 5B) enlistados en la Tabla 1.

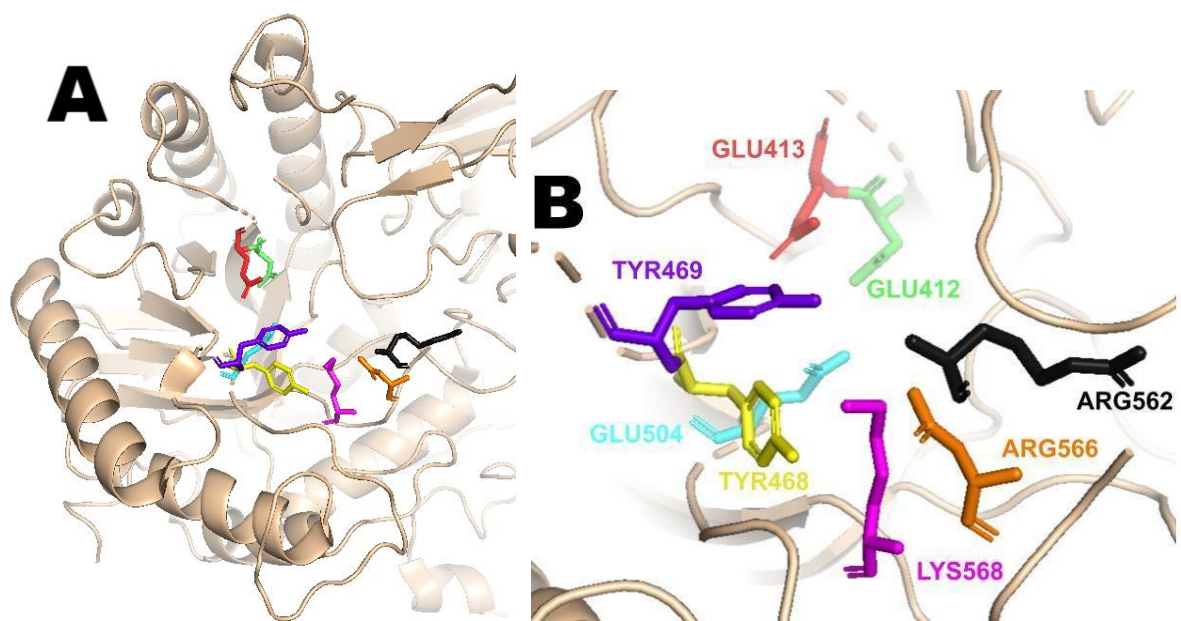


Figura 4. β GLU de *E. coli*. (A) Sitio activo del dímero de la β GLU *E. coli* (PDB 3K46, resolución 2.5 Å). (B) Residuos del sitio activo de la β GLU *E. coli*. Imágenes obtenidas en Pymol.

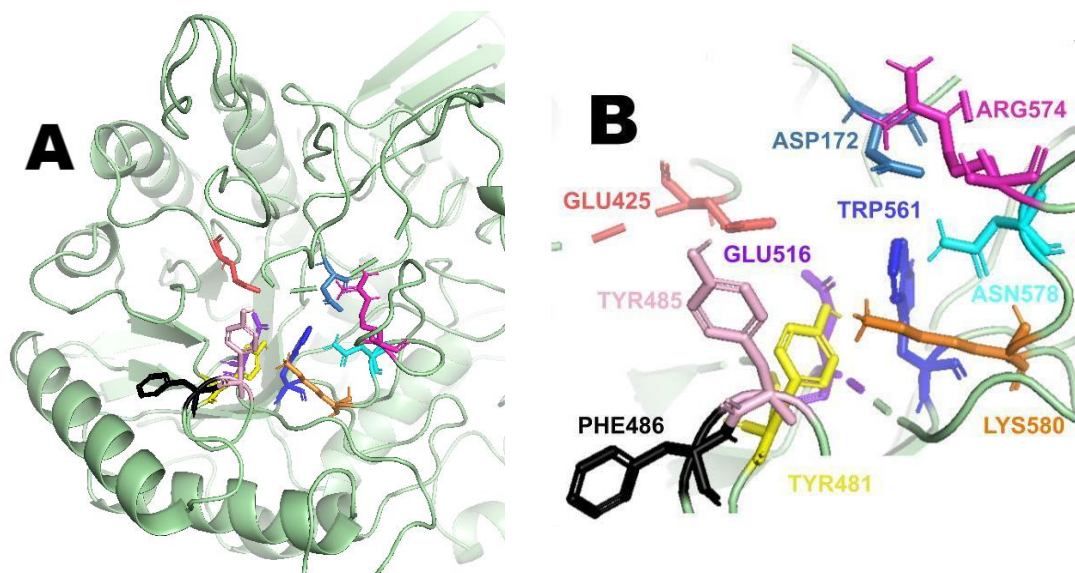


Figura 5. β GLU de *E. eligens*. (A) Sitio activo del dímero de la β GLU *E. eligens* (PDB 6BJW, resolución 3 Å). (B) Residuos del sitio activo de la β GLU *E. eligens*. Imágenes obtenidas en Pymol.

Como se observa, los dos residuos catalíticos principales de la β GLU de *E. coli*, Glu413 y Glu504, se encuentran en loops y están cercanos uno del otro, debido a su acción catalítica [13]. Los otros residuos, incluyendo Asn412, Glu413, Tyr468, Tyr469, Tyr472, Glu504, Arg562, Asn566 y Lys568, que tapizan el sitio activo como se aprecia en la

Figura 3B. De esos 9 residuos catalíticos, 2 presentan carga positiva (Arg562 y Lys568) y 2 tienen carga negativa (Glu413, Glu504) a pH neutro.

Por su parte, la β GLU de *E. eligens* presenta 10 residuos en el sitio activo incluyendo Asp172, Glu425, Tyr481, Tyr484, Phe486, Glu516, Trp561, Arg574, Asn578 y Lys580. Todos ellos son adyacentes unos con otros y se encuentran en loops (Figura 4). En el sitio catalítico de esta enzima, 3 residuos tienen carga negativa (Asp172, Glu425 y Glu516) y 2 carga positiva (Arg574 y Lys580). Todos esos residuos ionizables, en ambas enzimas, son de particular interés en este trabajo pues su estado de carga varía con el pH.

Al comparar los sitios activos de ambas enzimas mediante la superposición de estructuras, se reconocieron los residuos catalíticos en ambas homólogas, siendo Glu413 y Glu504 en *E. coli* equivalentes a Glu426 y Glu516 de *E. eligens* (Figura 6).

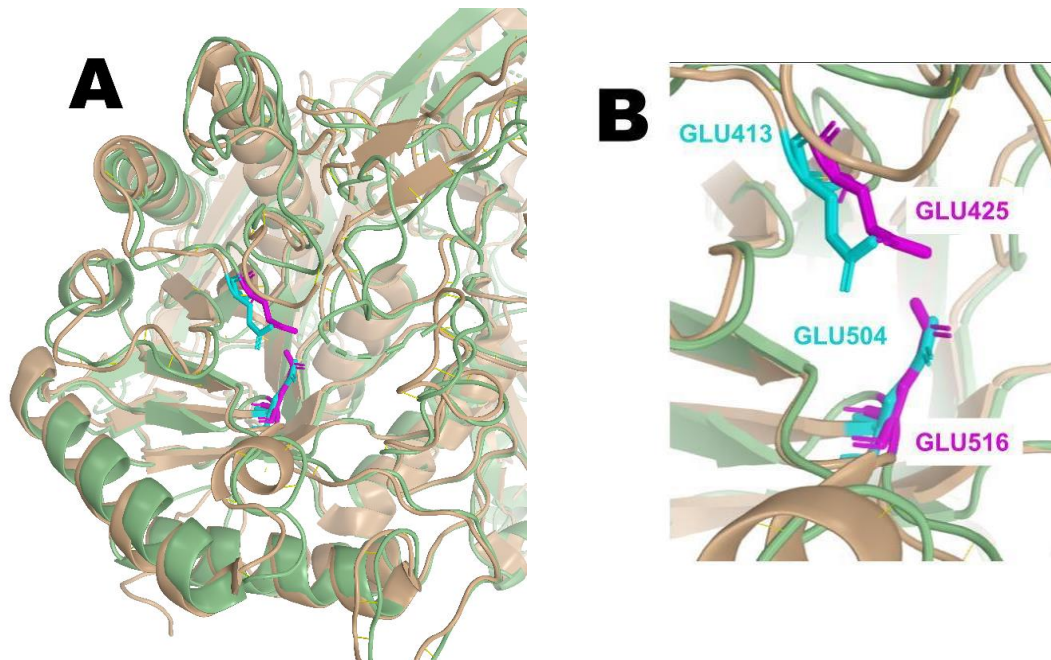


Figura 6. (A) Superposición de la β GLU de *E. coli* (PDB 3K46), en color naranja con residuos de color cyan, y *E. eligens* (PDB 6BJW), de color verde y con los residuos de color magenta. (B) Reconocimiento de los residuos catalíticos en ambas homólogas, Glu413 y Glu504 en β GLU *E. coli* y Glu425 y Glu516 en β GLU *E. eligens*. Imágenes obtenidas en Pymol.

En general, se observó una alta similitud estructural en la región catalítica de ambas enzimas, reflejado por un bajo RMSD de 0.94 Å, reconociéndose otros residuos equivalentes en el sitio catalítico de ambas enzimas, tal como muestra Tabla 3.

Tabla 3. Residuos equivalentes en el sitio activo de las βGLU de estudio

<i>E. coli</i>	<i>E. eligens</i>
Glu413	Glu425
Glu504	Glu516
Asn566	Asp578
Lys568	Lys580
Tyr472	Tyr485
Arg562	Arg574

Con el interés de comparar la topología y tamaño de los sitios activos, se definió el sitio de unión de cada enzima mediante Protein-plus. El sitio de unión de la βGLU de *E. coli* (Figura 7) resultó más grande (774.7 Å³) que el de *E. eligens* (608.63 Å³) (Figura 8).

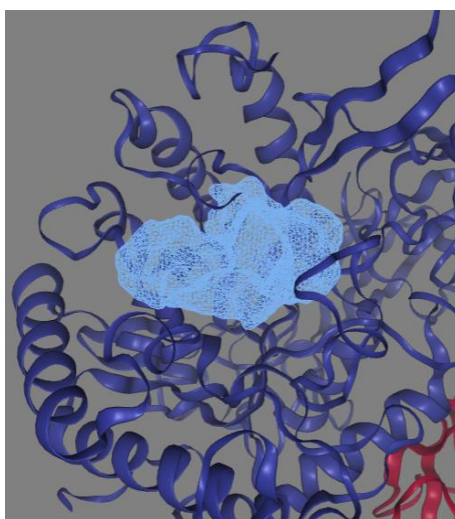


Figura 7. Topología del sitio de unión en el sitio activo de la βGLU de *E. coli* (PDB 3K46) obtenido en Protein plus.

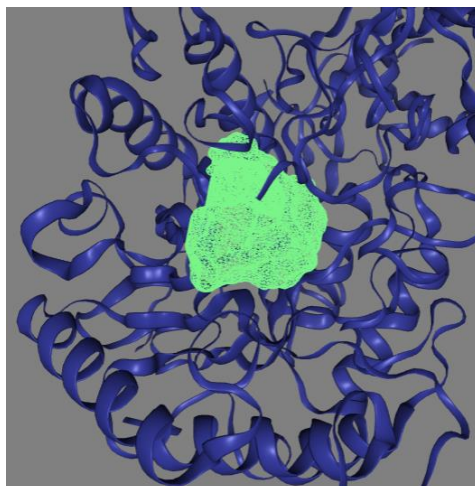


Figura 8. Topología del sitio de unión en el sitio activo de la β GLU de *E. eligens* (PDB 6BJW) obtenido en Protein plus.

En el análisis de la superficie electrostática de ambas enzimas descargadas del PDB, utilizando PyMOL, se examinaron las β -glucuronidasas (β GLU) de *E. eligens* (6BJW) y *E. coli* (3K46). Se observó la presencia de cargas tanto positivas como negativas en las superficies de ambas enzimas. Sin embargo, se notó que el bolsillo de la β GLU de *E. eligens* presenta una menor concentración de cargas en comparación con la β GLU de *E. coli*, lo que se traduce en una menor presencia de áreas azules y rojas (positivas y negativas) y más áreas blancas en la β GLU de *E. eligens*. No obstante, en el área donde se encuentran los residuos activos, ambas enzimas muestran áreas rojas que indican carga negativa (Figuras 9 y 10).

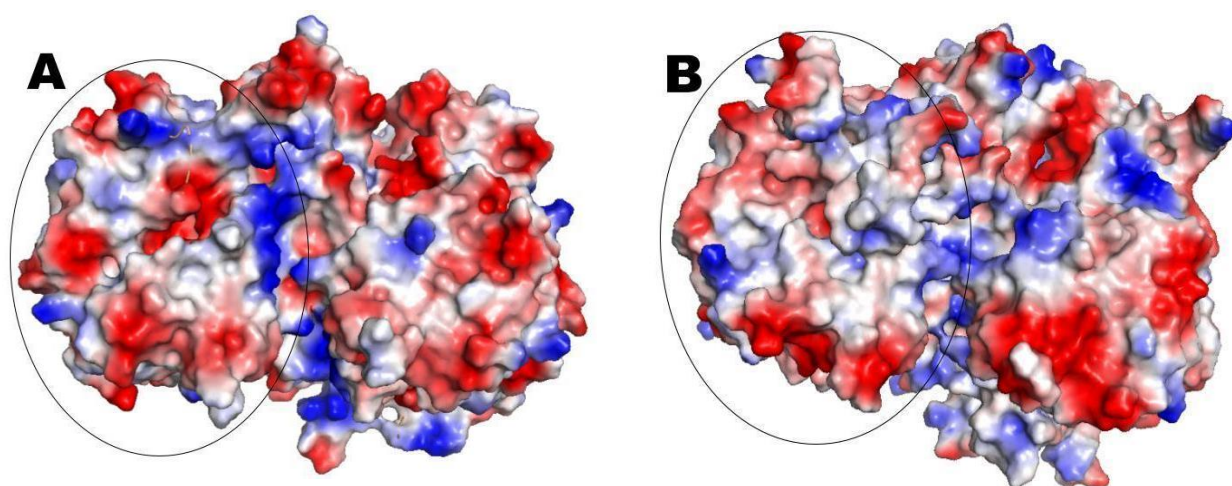


Figura 9. Superficie electrostática sólida del potencial electrostático (Pymol) de ambas enzimas a pH óptimo y enfoque al sitio activo (A) β GLU de *E. coli*.(B) β GLU de *E.*

eligens. Zonas azules indican concentración de cargas positivas y las zonas rojas concentración de cargas negativas.

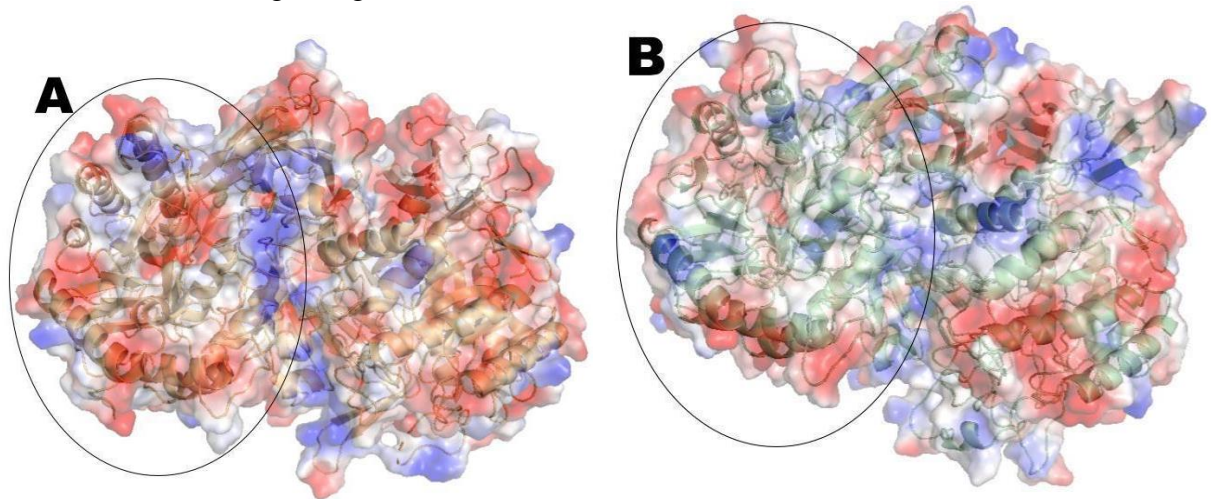


Figura 10. Imagen con transparencia y enfoque al sitio activo pH óptimo(Pymol) (A) β GLU de *E. coli*. (B) β GLU de *E. eligens*. Zonas azules indican concentración de cargas positivas y las zonas rojas concentración de cargas negativas.

Usando el PDBSum, se determinó las interacciones proteína-proteína de la zona de homodimerización de la β GLU *E. coli* (Tabla 4). Como se aprecia, las interacciones intermoleculares entre las cadenas A y B incluyen 6 puentes de hidrógeno y 6 puentes salinos en los que están involucrados 3 residuos cargados (Lys77, Arg302, Asp307) y uno no cargado (Thr7). Es decir, el dímero de β GLU *E. coli* está estabilizado por hasta 12 enlaces débiles en la zona de dimerización.

Tabla 4. Puentes de Hidrógeno en zona de homodimerización β GLU *E. coli*

Tipo de interacción	Cadena A	Cadena B	Número de enlaces
Puentes de Hidrógeno	Lys77	Thr7	1
	Arg302	Asp307	3
	Asp307	Arg302	2
Puentes salinos	Arg302	Asp307	3
	Asp307	Arg302	3

*Las celdas de color celeste indican carga positiva del residuo, mientras que el color rojo indica carga negativa y sin color indica sin carga.

En la β GLU de *E. eligens* las interacciones intermoleculares fueron predichas mediante el programa PDBePISA. Las interacciones intermoleculares entre las cadena A y B incluyen 8 puentes de hidrógeno y 6 puentes salinos (Tabla 5) en los que están involucrados 8 residuos cargados (Asp14, Glu357, Lys326, Asp52, Glu55, Lys270, Lys326 y Asp125) y 2 no cargados (Leu12 y Thr43). Es decir, el dímero de β GLU de *E. eligens* se estabiliza gracias a la presencia de hasta 14 enlaces débiles en la zona de dimerización, mientras que su homóloga en β GLU *E. coli* presenta dos enlaces menos en esta región. Es importante destacar que nos enfocamos específicamente en los enlaces que involucran residuos cargados en nuestro análisis.

Tabla 5. Puentes de Hidrógeno en zona de homodimerización β GLU *E. eligens*

Tipo de interacción	Cadena A	Cadena B	Número de enlaces
Puentes de Hidrógeno	Asp14	Leu12	1
	Thr43	Glu357	1
	Lys326	Asp52	1
		Glu55	1
	Leu12	Asp14	1
	Glu357	Thr43	1
	Asp52	Lys326	1
	Glu55		1
Puentes salinos	Lys270	Asp125	1
	Lys326	Glu55	2
	Asp125	Lys270	1
	Glu55	Lys326	2

*Las celdas de color azul indican carga positiva del residuo, mientras que el color rojo indica carga negativa y sin color indica sin carga.

A continuación, observamos las estructuras 3D de ambas enzimas e identificamos los residuos que participan en las interacciones intermoleculares (entre las 2 cadenas) tal como se aprecia en las Figuras 11 y 12 según las tablas 4 y 5.

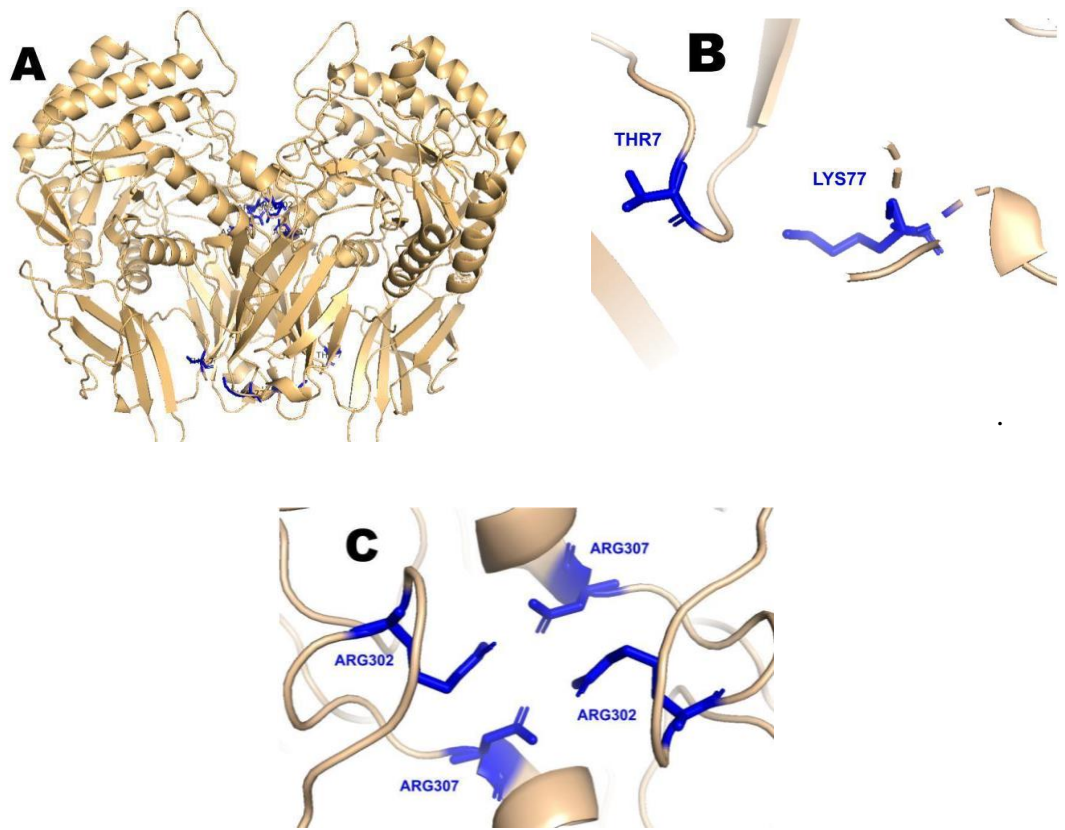


Figura 11. (A). Residuos en la zona de homodimerización de la β GLU *E. coli*. (B) Acercamiento de los residuos Thr7 con Lys77 (C) Arg302 con Arg307 observado mediante el programa Pymol

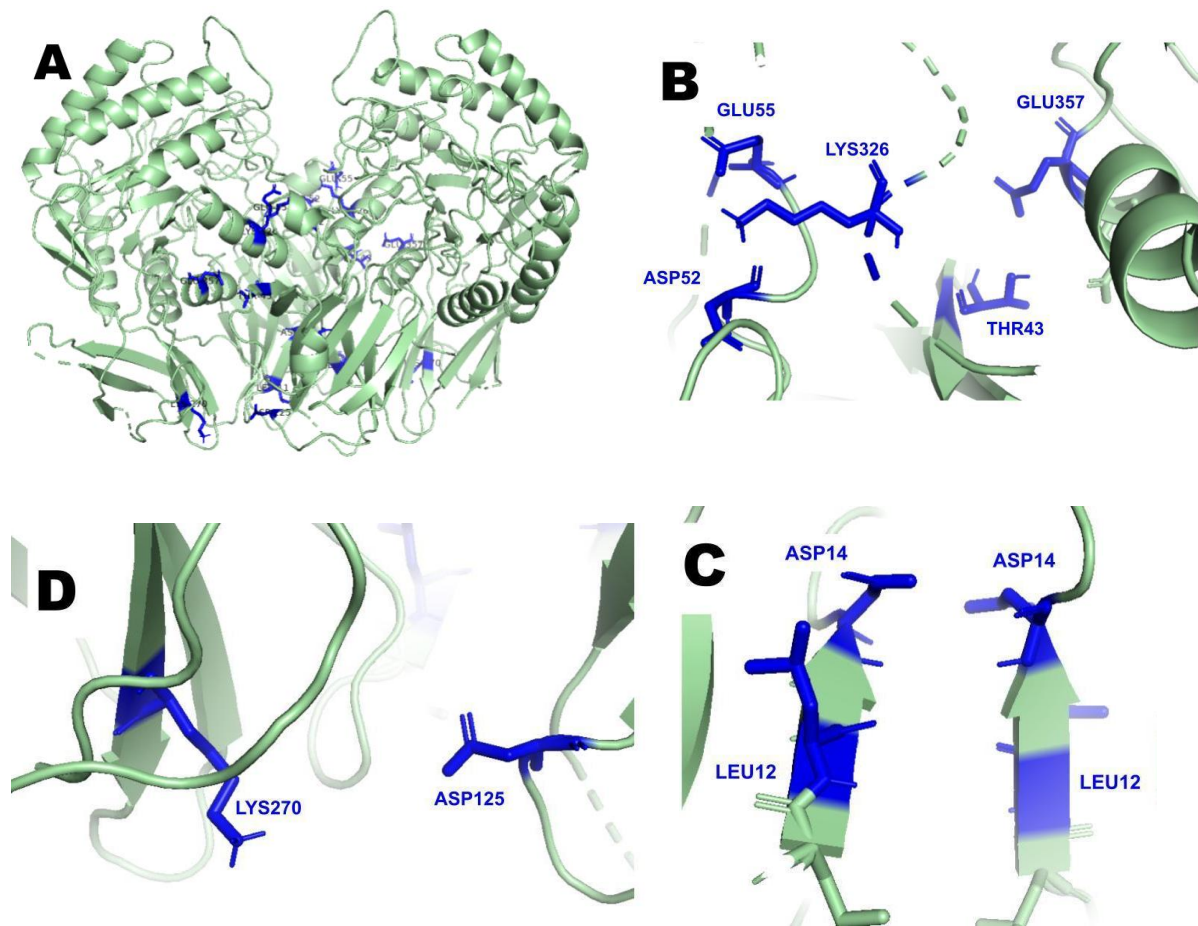


Figura 12. (A). Residuos en la zona de homodimerización de la β GLU *E. eligens*. Acercamiento de los residuos desde una vista superior. (B) Lys326 con Glu55 y Asp52 (C)Leu12 con Asp14 (D) Lys270 con Asp125. Observado mediante el programa Pymol

Finalmente, se obtuvo el dímero de β GLU *E. eligens* usando GalaxyWeb, ya que no se disponía del dímero en la base de datos PDB. Dicha estructura fue comparada con el dímero de *E. coli* revelando un RMSD de 1 Å lo cual sugiere que a nivel de la estructura 3D son bastantes similares (Figura 12). Además, se observó una similitud en la disposición de los helices alfa y beta, así como en la posición del sitio activo y los dominios al alinear, entre las β GLU de *E. coli* y *E. eligens*. Este resultado era de esperarse dado que ambas enzimas son homólogas.

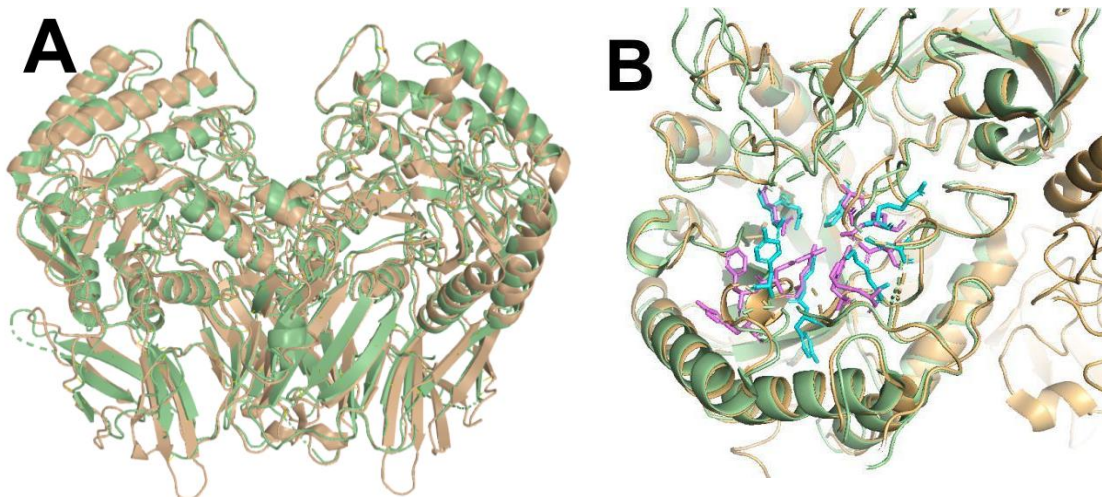


Figura 13. Alineamiento entre la β GLU de *E. coli* (3K46) de color naranja y el dímero modelado por GalaxyWeb la β GLU *E. elgens* reconstruido a partir del monómero (6BJW) de color verde.(A) Vista de todo el dímero (B) vista enfocada al sitio activo donde se observa similitud en la disposición de los pliegues alfa y beta . observado mediante el programa Pymol

6.3 Estimación de cargas a pH óptimo y ácido

Para analizar los cambios en las cargas electrostáticas de las β -glucuronidasas (β GLU) debido a la acidificación del medio (disminución del pH), se realizó un estudio comparativo en tres condiciones: las estructuras obtenidas directamente del Protein Data Bank (PDB), las enzimas computadas a pH óptimo mediante Playmolecule, y las enzimas computadas a pH ácido utilizando la misma plataforma. Primero, se evaluó el potencial electrostático de las β GLU de *Escherichia coli* y *Eubacterium elgens* obtenidas directamente del PDB, utilizando PyMOL para visualizar sus superficies electrostáticas. Por otro lado, las enzimas computadas a pH óptimo y pH ácido en Playmolecule se procesaron en eF-surf, y sus potenciales electrostáticos se visualizaron y analizaron mediante este programa (Figuras 14 y 15).

Las β GLU obtenidas directamente del PDB, que corresponden a estructuras resueltas experimentalmente a pH óptimo, mostraron un potencial electrostático muy similar al de las enzimas computadas a pH óptimo mediante Playmolecule y visualizadas en eF-surf(Figuras 14A, 14B, 15A y 15B). Esta similitud sugiere que las simulaciones

computacionales reproducen similares condiciones fisiológicas de las enzimas. Sin embargo, al comparar estos resultados con las enzimas computadas a pH ácido, se observaron diferencias significativas en la distribución de cargas. Las superficies electrostáticas de las β GLU a pH ácido presentaron patrones alterados, con regiones que mostraron neutralización o inversión de cargas (Figuras 14C y 15C), lo que indica un impacto notable de la acidificación en la estructura electrostática de las enzimas.

Sin embargo, a pH ácido ambas enzimas tuvieron un cambio en su potencial electrostático, donde las cargas negativas se volvieron positivas en su mayoría, sin embargo también se observó presencia de cargas neutras (Figuras 14C y 15C). La concentración de residuos con carga positiva es mucho mayor a pH ácido que a pH óptimo.

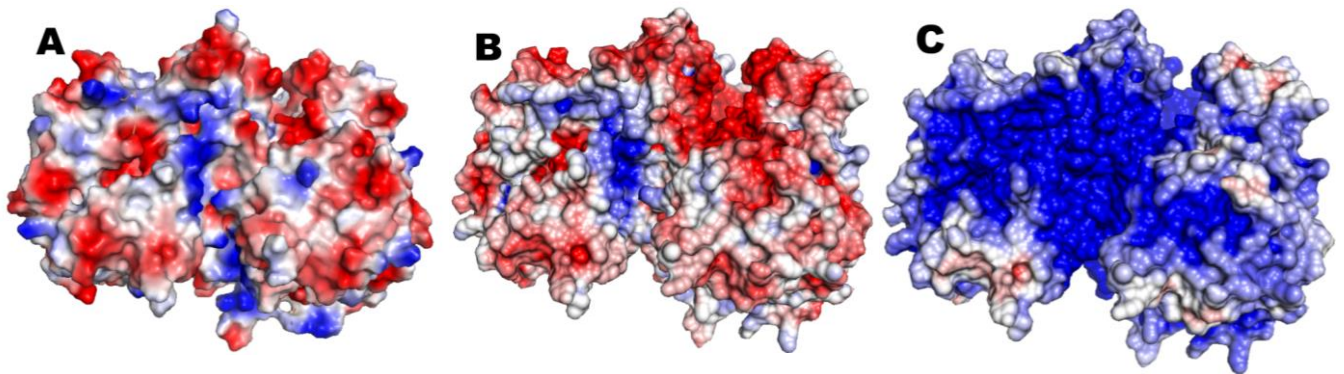


Figura 14. Potencial electrostático de la β GLU *E. coli*, forma apo y monomérica a diferentes pHs. (A) Estructura extraída del PDB (3K46) a pH 7.4 observada por el programa Pymol. (B) A pH 7.4 (óptimo) observada por el programa eF-surf. (C) A pH 3 (ácido) observada por el programa eF-surf.

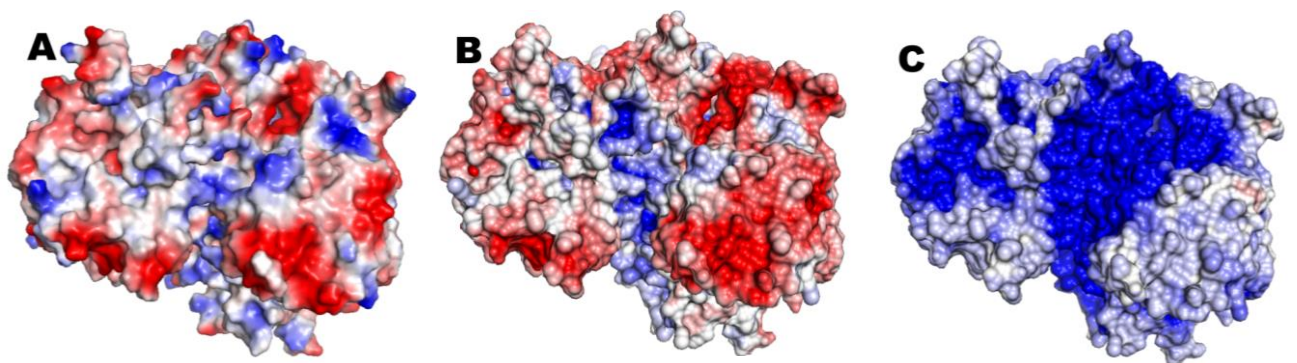


Figura 15. (A) Potencial electrostático de β GLU *E. eligens* forma apo del PDB (6BJW) a pH 6.5 observada por el programa Pymol. (B) Potencial electrostático de β GLU *E.*

eligens a pH 6.5 (Óptimo) observada por el programa eF-surf. (C) Potencial electrostático de β GLU *E. eligens* a pH 3 (Ácido) observada por el programa eF-surf.

6.4 Resultados de la Dinámica Molecular

Una vez concluída la DM de las enzimas de estudio de 50 ns cada una (a pH óptimo y pH ácido), se obtuvo el RMSD, RMSF, Rg, puentes de hidrógeno y el SASA.

6.4.1 Resultados de la β GLU de *E. coli*

6.4.1.1. Diferencias estructurales (RMSD) en la β GLU *E. coli* a pH 7.4 y 3

El RMSD resultante de la DM cuantifica la distancia promedio entre los átomos de estructuras proteicas superpuestas durante un período de tiempo determinado. Al analizar las gráficas de RMSD (Figura 16), se observa que su fluctuación a pH 3 es mucho mayor que a pH 7.4. Es decir, la estructura sometida a pH ácido sufrió más cambios (con relación a la estructura inicial introducida) que la estructura a pH óptimo. A lo largo de la trayectoria, el valor promedio del RMSD de la β GLU *E. coli* a pH 7.4 fue menor (0.2 nm) que a pH 3 (0.32 nm). Así mismo, el valor máximo de desviación fue de 0.25 nm a los 19.4 ns vs 0.40 nm a los 45 ns, a pH 7.4 y pH 3, respectivamente. Al final de la DM, la β GLU *E. coli* a pH 7.4 presenta un RMSD menor (0.21 nm) que el calculado a pH 3 (0.33 nm). En resumen, la conformación de la β GLU *E. coli* presentó más rearrreglos conformacionales durante la DM a pH 3 que a pH 7.4.

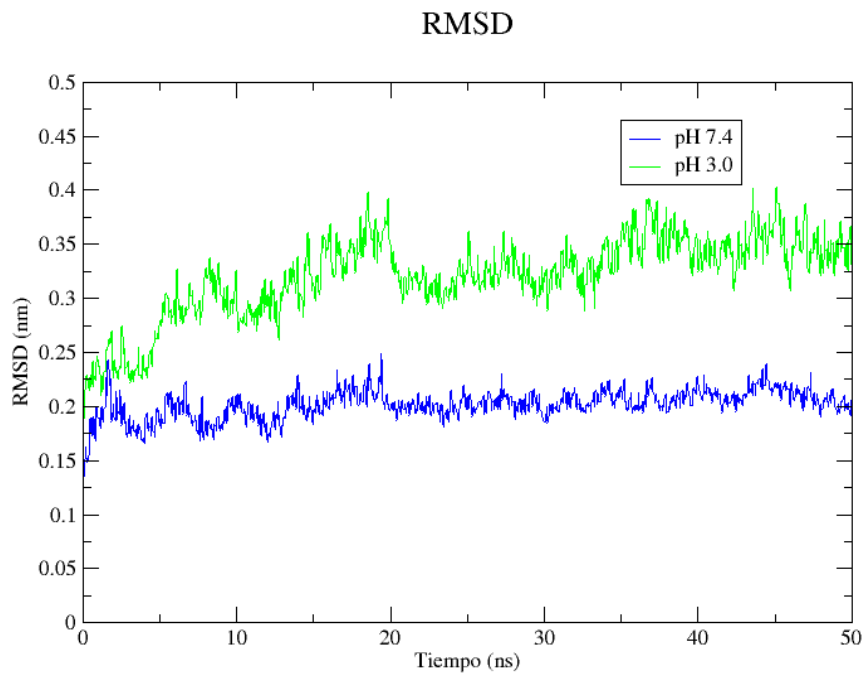


Figura 16. Evolución del RMSD a lo largo de 50 ns de simulación con la β GLU *E. coli*. pH 7.4 y pH 3.0.

6.4.1.2. Diferencias del RMSF en la β GLU *E. coli* a pH 7.4 y 3

El RMSF evalúa la flexibilidad o fluctuación de las posiciones atómicas de la proteína durante la DM al cuantificar la desviación promedio de cada átomo con respecto a su posición media. Según la Figura 17, la región de barril TIM (desde el residuo 274 hasta el residuo 593) de la β GLU *E. coli* muestra un valor promedio de RMSF de 0.12 nm a pH 7.4, mientras que a pH 3, el valor se incrementa a un promedio de 0.15 nm. Los resultados muestran que el barril TIM exhibe mayores fluctuaciones conformacionales (valores de RMSF más elevados) a pH 3 en comparación con pH 7.4. Este comportamiento diferencial resulta particularmente significativo desde el punto de vista funcional, ya que esta región estructural alberga el sitio activo de la enzima, el cual se encuentra topológicamente rodeado por elementos de estructura secundaria que incluyen hélices alfa y láminas beta. La mayor flexibilidad observada en condiciones ácidas podría tener implicaciones directas en la estabilidad del centro catalítico y, consecuentemente, en la actividad enzimática.

Además, al observar la gráfica de RMSF de la β GLU *E. coli* (Figura 17), notamos que presenta un mayor número de picos a pH 3 que a pH 7.4, siendo el promedio de RMSF a pH 3 mayor (0.16 nm) que a pH 7.4 (0.12 nm).

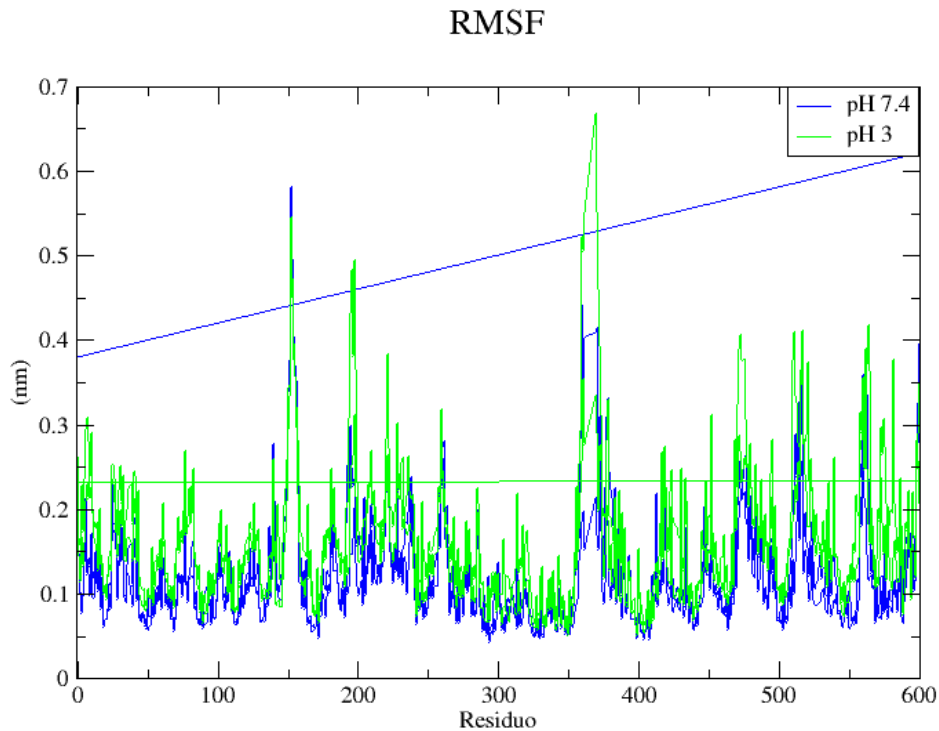


Figura 17. Evolución del RMSF (nm) a lo largo de 50 ns de simulación con la β GLU *E. coli*. pH 7.4 y pH 3.0.

*La línea de la gráfica atraviesa el RMSF del primer residuo y del último residuo.

También se evaluó las fluctuaciones en los residuos del sitio activo durante la DM (Tabla 6). Nuevamente observamos que la fluctuación en los residuos del sitio activo a pH 3 fue mayor que a pH 7.4, aunque los principales residuos del sitio activo, Glu413 y Glu504, presentaron una diferencia de fluctuación ligera de unos 0.01 nm. En resumen, se observó que la β GLU *E. coli* presenta un mayor rearrreglo de residuos en el sitio activo cuando se encuentra a pH 3 en comparación con un. pH 7.4.

Tabla 6. Diferencia del RMSF en los residuos del sitio activo de la β GLU *E. coli* a pH 7.4 y pH 3.

Residuo	RMSF pH 7.4	RMSF pH 3	Diferencia RMSF pH3 - pH7.4
Asn412	0,0924 nm	0,1022 nm	0,0098 nm
Glu413	0,1072 nm	0,1174 nm	0,0102 nm
Tyr468	0.098 nm	0.1422 nm	0.0442 nm
Tyr469	0.1957 nm	0.2828 nm	0.0871 nm
Tyr472	0,1918 nm	0,2874 nm	0,0956 nm
Glu504	0,0991 nm	0,1125 nm	0,0134 nm
Arg562	0,2009 nm	0,3906 nm	0,1897 nm
Asn566	0,1229 nm	0,2015 nm	0,0786 nm
Lys568	0,1107 nm	0,1455 nm	0,0348 nm

También se evaluó las variaciones del RMSF en residuos implicados en los puentes salinos dentro de la zona de homodimerización (Tabla 7). Se observó un mayor valor de RMSF a pH 3 en comparación con pH 7.4, lo que indica que los residuos que forman puentes salinos presentaron una mayor movilidad a pH 3 en comparación con pH 7.4.

Tabla 7. Diferencia en el RMSF de los residuos implicados en los puentes salinos dentro de la zona de homodimerización de la β GLU de *E. coli* a pH 7.4 y pH 3

Residuo	RMSF pH 7.4	RMSF pH 3	Diferencia RMSF pH3 - pH7.4
Arg302	0,0753 nm	0,0805 nm	0,0052 nm
Arg307	0,0952 nm	0,1216 nm	0,0264 nm

Como se mencionó, otras regiones del dominio TIM barrel que exhibieron fluctuaciones significativas ($>2 \text{ \AA}$ según los análisis de RMSF) durante la dinámica molecular a pH 3 se detallan en la Tabla 8. La ubicación estructural de estos residuos se ilustra en la Figura 18, donde se destacan en el contexto de la arquitectura del dominio TIM barrel.

Tabla 8. Residuos del dominio TIM barrel con fluctuaciones significativas (RMSF > 2 Å / 0.2 nm) en la dinámica molecular β GLU de *E. coli* a pH 3 .

Residuo	RMSF pH 3	Residuo	RMSF pH 3
Lys361	0,5073 nm	Ala512	0,2293 nm
Leu362	0,5524 nm	Ile513	0,2115 nm
Asn369	0,668 nm	Glu514	0,2575 nm
Glu370	0,551 nm	Leu515	0,2408 nm
Arg373	0,3114 nm	Glu516	0,3483 nm
Gln419	0,2726 nm	Asp517	0,4126 nm
Leu469	0,2828 nm	Ile518	0,2823 nm
Asp471	0,2154 nm	Leu519	0,2402 nm
Ile472	0,2874 nm	Gln520	0,2215 nm
Asn473	0,2677 nm	Gly535	0,2327 nm
Leu474	0,2347 nm	Leu558	0,2713 nm
Glu475	0,2622 nm	Glu559	0,2838 nm
Val476	0,2543 nm	Arg560	0,312 nm
Arg479	0,2779 nm	Leu561	0,2492 nm
Leu480	0,2248 nm	Glu574	0,267 nm
Glu483	0,2359 nm	Arg595	0,2202 nm

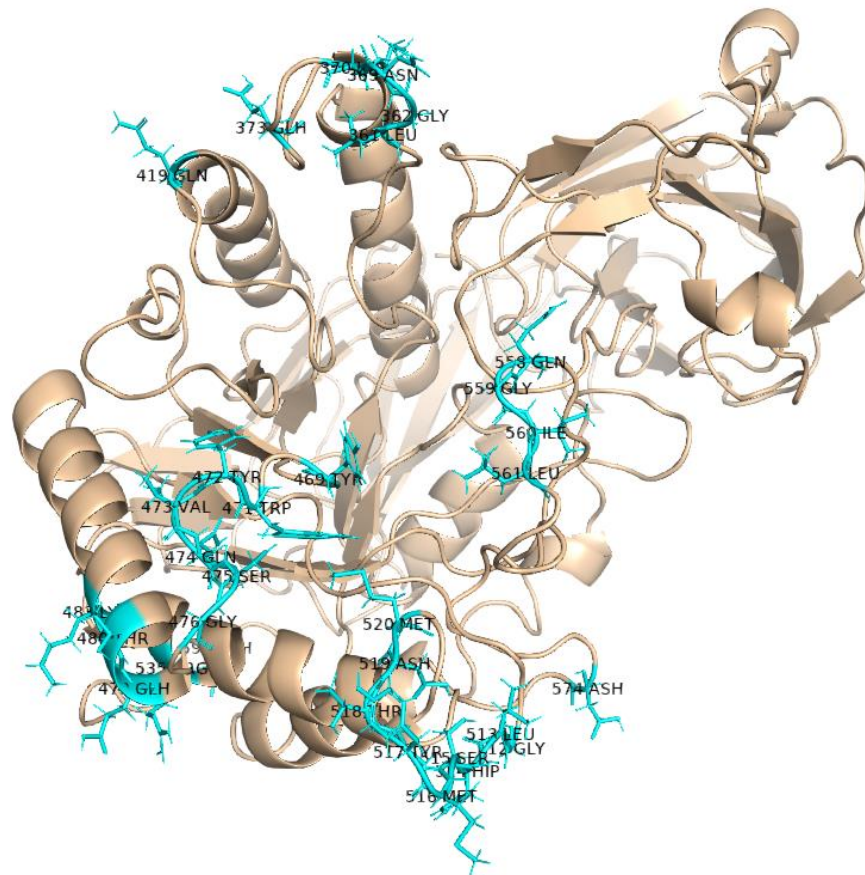
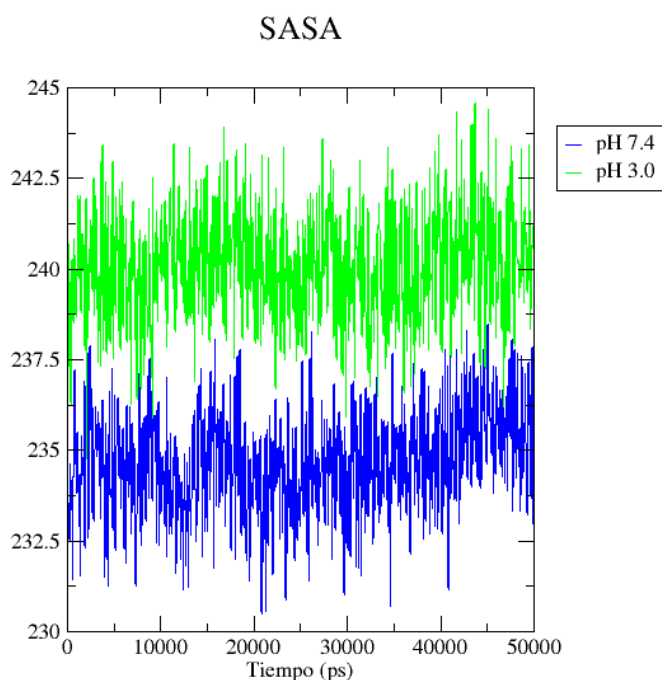


Figura 18. Residuos con alta flexibilidad ($RMSF > 2 \text{ \AA} / 0.2 \text{ nm}$) en el dominio TIM barrel de la β GLU *E. coli* a pH 3 obtenido en Pymol.

6.4.1.3. Diferencias del SASA en la β GLU *E. coli* a pH 7.4 y 3

El SASA es una medida que indica cuánta superficie de la proteína está expuesta al solvente por lo que valor nos muestra regiones proteicas potenciales de interacción con su entorno. Las gráficas de SASA obtenidas de las estructuras resultantes de la DM (Figura 19) indican que la β GLU *E. coli* presenta mayor área expuesta al solvente a pH 3 (valor máximo de 540.39 nm²) 14900 ps que a pH 7.4 (valor máximo de 502.68 nm²) 43350 ps. Así mismo, el SASA promedio de la β GLU *E. coli* fue mayor a pH3 (522.0 nm²) durante la DM que a pH 7.4 (483.17 nm²). Es decir, la exposición al solvente aumenta cuando la β GLU *E. coli* es expuesta a pH 3 comparada a una condición a pH



7.4.

Figura 19. Evolución del SASA a lo largo de 50 ns de simulación con la β GLU *E. coli* pH 7.4 y pH 3.0.

6.4.1.4. Diferencias del Radio de giro de la β GLU *E. coli* a pH 7.4 y 3

El radio de giro es la distancia que tienen los residuos con el eje de rotación de la enzima, el cual se define según la masa de la proteína. Este es un parámetro útil para monitorear el plegamiento de la proteína. Al inicio de las simulaciones de DM, el radio de giro de β GLU *E. coli* fue de 3,15 nm aproximadamente, a ambos pHs. Durante la DM, los valores

de radio de giro de la β GLU *E. coli* a pH 7.4 fueron entre 3.2-3.24 nm aproximadamente , mientras que a pH 3 fluctuaron entre 3.225-3.3 mm aproximadamente (Figura 20). Además el pico máximo que alcanzó el Radio de giro a pH 7.4 fue de 3.24 nm a los 13700 ps, mientras que a pH 3 alcanzó un valor de 3.31 nm a los 48650 ps.

Así mismo, observamos que a partir de 20000 ps de la simulación , ambas gráficas presentan menos variaciones, siendo el promedio de radio de giro de 3.22 nm a pH 7.4 y de 3.28 nm pH 3. Al final de la simulación, el Radio de giro es muy similar entre ambos pHs, siendo la diferencia de <0.1 nm.

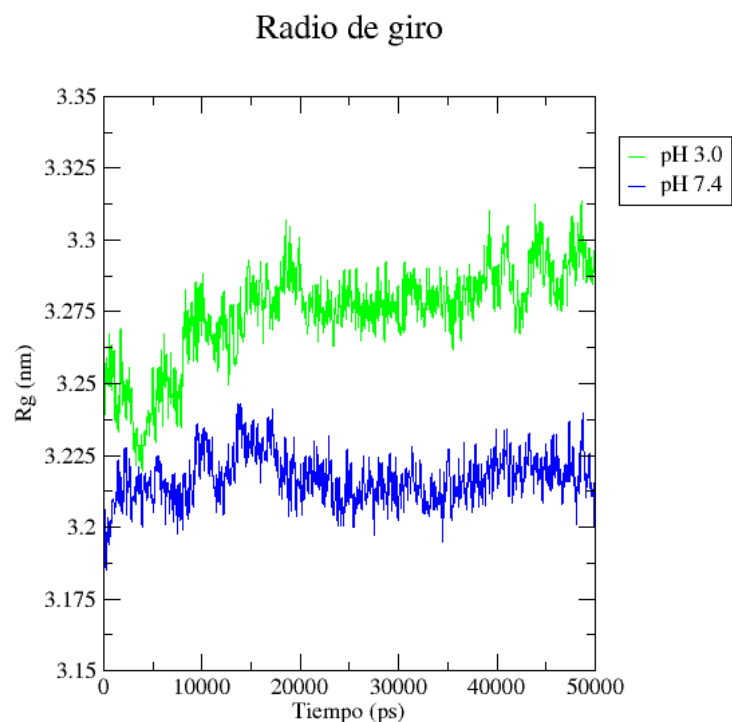


Figura 20. Evolución del Radio de giro a lo largo de 50 ns de simulación con la β GLU *E. coli*. pH 7.4. y pH 3.0

6.4.1.5. Diferencias en los Enlaces de Hidrógeno de la β GLU *E. coli* a pH 7.4 y 3

Al analizar las gráficas de enlaces de hidrógeno, notamos que la enzima tiene más enlaces de hidrógeno a pH 7.4 que a pH 3 (Figura 21). El número de enlaces de hidrógeno se redujo conforme transcurría la simulación de DM, tanto a pH 7.4 como a pH 3, hasta un mínimo de 885 y 789, a pH 7 y 3, es decir, tienen una diferencia de aproximadamente 100 enlaces de hidrógeno. En resumen, la β GLU *E. coli* a pH 3 pierde enlaces de

hidrógeno en comparación con la condición de pH neutro (pH 7.4), lo cual podría afectar su conformación estructural.

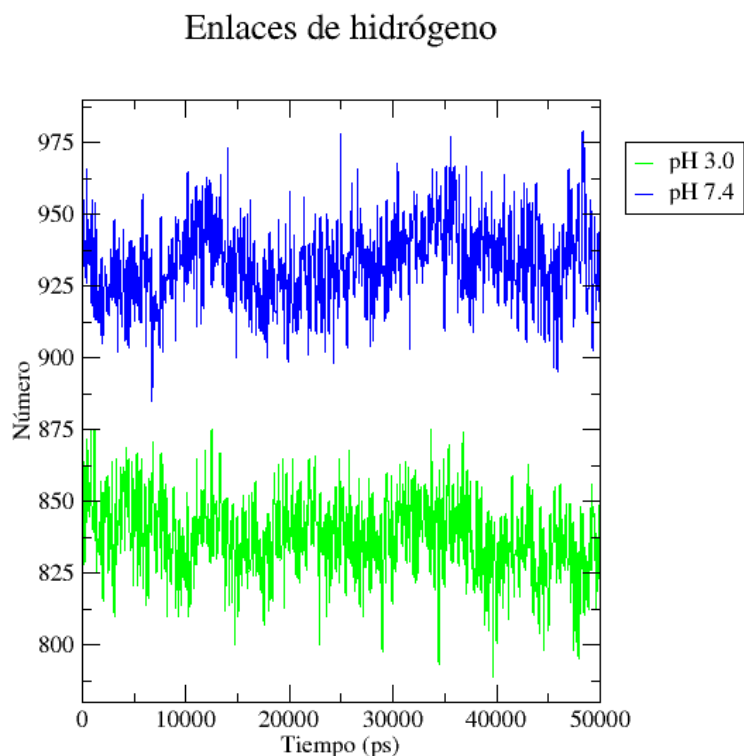


Figura 21. Evolución de Enlaces de hidrógeno a lo largo de 50 ns de simulación con la β GLU *E. coli* pH 7.4 y pH 3.0.

6.4.2 Resultados de β GLU *E. eligens*

6.4.2.1 Diferencias RMSD de las β GLU *E. eligens* a pH 6.5 y 3 .

La comparación de las gráficas RMSD según la Figura 22, se destaca que la trayectoria RMSD a pH 3 presenta desviaciones mayores a comparación de la trayectoria RMSD a pH 6.5. Al comparar los valores máximos de desviación a los diferentes pHs, se observó que el valor máximo fue mayor a pH 3 con una desviación de 0.46 nm, mientras que a pH 6.5 fue de 0.43nm. Además, al final de la trayectoria la β GLU *E. eligens* a pH 6.5 presenta un RMSD de 0.34 nm y a pH 3 presenta un RMSD de 0.38 nm.

A lo largo de la trayectoria se observa que los valores RMSD de la β GLU *E. eligens* a pH 6.5 tienen un promedio de 0.33 nm, en cambio la trayectoria RMSD a pH 3 tiene un

promedio mayor de 0.39 nm. Nos indica que las desviaciones que presentó la β GLU *E. eligens* a pH 6.5 en promedio fueron menores que las desviaciones la β GLU *E. eligens* a pH 3.

El análisis de esta gráfica RMSD nos muestra que la conformación de la β GLU *E. eligens* a pH 3 presentó más rearrreglos conformacionales que la β GLU *E. eligens* a pH 6.5.

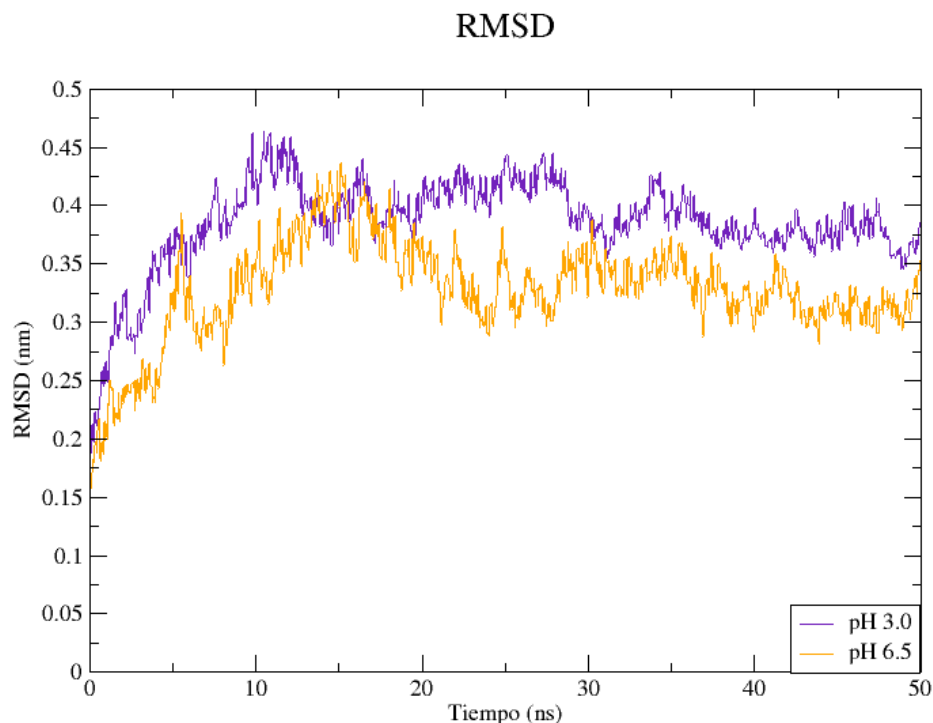


Figura 22. Evolución del RMSD de 50 ns de simulación con la β GLU *E. eligens* pH 6.5 y pH 3

6.4.2.2. Diferencias RMSF de las β GLU *E. eligens* a pH 6.5 y 3

Las gráficas RMSF de β GLU *E. eligens* a diferentes pH, en la Figura 23. A pH 6.5 se observó que la región de barril TIM (desde el residuo 287 hasta el residuo 603) de la β GLU *E. eligens* muestra un valor promedio de RMSF de 0.15 nm, mientras que a pH 3, este valor se incrementa a un promedio de 0.17 nm. Los resultados muestran que el barril TIM exhibe mayores fluctuaciones conformacionales (valores de RMSF más elevados) a pH 3 en comparación con pH 6.5. Este comportamiento diferencial resulta particularmente significativo desde el punto de vista funcional, ya que esta región estructural alberga el sitio activo de la enzima, el cual se encuentra topológicamente rodeado por elementos de estructura secundaria que incluyen hélices alfa y láminas beta.

La mayor flexibilidad observada en condiciones ácidas podría tener implicaciones directas en la estabilidad del centro catalítico y, consecuentemente, en la actividad enzimática.

Además, al observar la gráfica de RMSF de la β GLU *E. eligens*, notamos que presenta un mayor número de picos a pH 3 en comparación con pH 6.5. Por lo tanto, el promedio de RMSF a pH 3 (0.18 nm) es mayor que el promedio a pH 6.5 (0.16 nm).

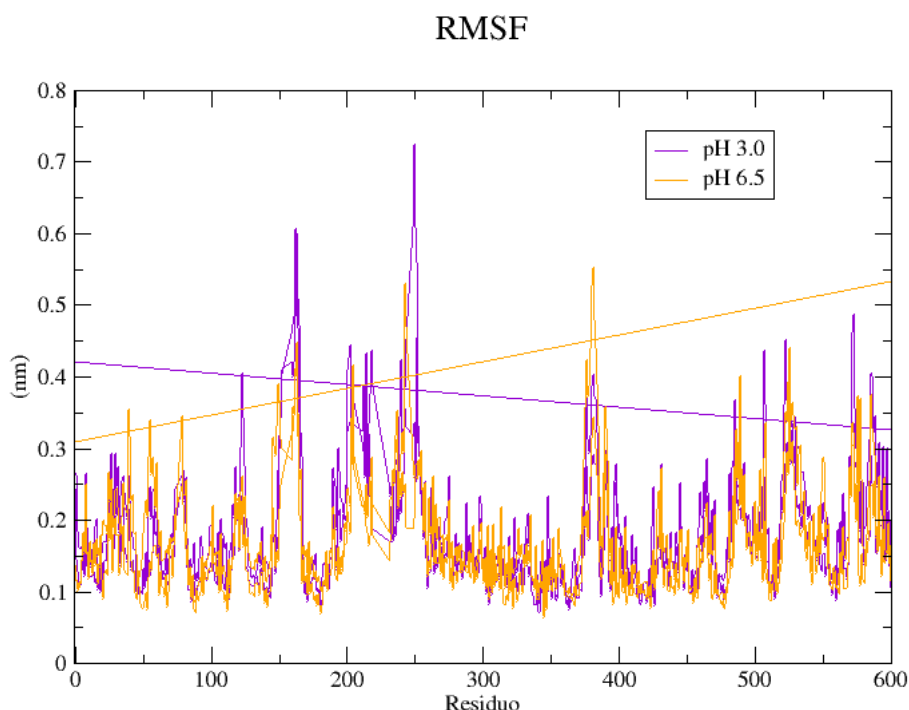


Figura 23. Evolución del RMSF (nm) de 50 ns de simulación con la β GLU *E. eligens* pH 6.5 y pH 3. *La línea representa el RMSF del primer residuo y el último residuo de la proteína, conectados entre sí para mostrar su comportamiento a lo largo de la estructura. De la misma manera se observó que 6 de los 10 mayores valores de fluctuación en los residuos activos se encontraron a pH 3 (Tabla 9). Sin embargo, los residuos activos principales 425 y 515 no presentaron una gran diferencia de fluctuación. Comparando las gráficas RMSF (Figuras 23) y la Tabla 9, observamos en general que los residuos a pH 3 presentan mayor fluctuación que un pH 6.5. Podemos decir que la β GLU *E. eligens* presenta mayor movilidad de aminoácidos a pH 3.

Tabla 9. Diferencia de RMSF en los sitios activos de la β GLU *E. eligens* a pH 6.5 y 3.

Residuo	RMSF a pH 6,5	RMSF a pH 3	Diferencia RMSF pH 3- pH 6.5
Asp172	0,1601 nm	0,136 nm	0,0241 nm
Glu425	0,1584 nm	0,1314 nm	0,027 nm
Tyr481	0,1197 nm	0,1439 nm	0,0242 nm
Tyr485	0,2367 nm	0,2995 nm	0,0628 nm
Phe486	0,3263 nm	0,2703 nm	0,056 nm
Glu516	0,1125 nm	0,092 nm	0,0205 nm
Tyr561	0,1058 nm	0,1867 nm	0,0809 nm
Arg574	0,2262 nm	0,3551 nm	0,1289 nm
Asn578	0,1098 nm	0,1687 nm	0,0589 nm
Lys580	0,1168 nm	0,2529 nm	0,1361 nm

Se realizaron evaluaciones de las variaciones en las RMSF implicados en los puentes salinos dentro de la zona de homodimerización (Tabla 10). Se observó que la mitad de los residuos involucrados en los puentes salinos presentó un mayor valor de RMSF a pH 6.5 en comparación con pH 3 y la otra mitad viceversa. Esto indica que los residuos involucrados en la formación de puentes salinos presentaron cambios en la movilidad de aminoácidos a pH 3.

Tabla 10. Diferencia en el RMSF de los residuos implicados en los puentes salinos dentro de la zona de homodimerización de la β GLU de *E. eligens* a pH 6.5 y pH 3

Residuo	RMSF a pH 6,5	RMSF a pH 3	Diferencia RMSF pH 3- pH 6.5
Glu55	0,1885 nm	0,1459 nm	0,0426 nm
Asp125	0,1797 nm	0,1695 nm	0,0102 nm
Lys270	0,1809 nm	0,2748 nm	0,0939 nm
Lys326	0,1419 nm	0,1231 nm	0,0188 nm

Otras regiones del dominio TIM barrel que exhibieron fluctuaciones significativas ($>2 \text{ \AA}$ según los análisis de RMSF) durante la dinámica molecular a pH 3 se detallan en la Tabla 11. La ubicación estructural de estos residuos se ilustra en la Figura 24, donde se destacan en el contexto de la arquitectura del dominio TIM barrel.

Tabla 11. Residuos del dominio TIM barrel con fluctuaciones significativas (RMSF > 2 Å / 0.2 nm) en la dinámica molecular β GLU de *E. eligens* a pH 3 .

Residuo	RMSF pH 3 (nm)	Residuo	RMSF pH 3 (nm)	Residuo	RMSF pH 3 (nm)
Ala298	0,2028 nm	Gly471	0,2287 nm	Asp531	0,2173 nm
Gly375	0,2373 nm	Ala484	0,2061 nm	Leu532	0,2234 nm
Phe376	0,2742 nm	Ser485	0,2995 nm	Ala533	0,2047 nm
Val377	0,223 nm	Met486	0,2703 nm	Gly535	0,2083 nm
Leu379	0,2363 nm	Asn487	0,2273 nm	Val536	0,2381 nm
Ser380	0,2793 nm	Thr488	0,2157 nm	Arg570	0,2482 nm
Glu381	0,292 nm	Val489	0,2162 nm	Val571	0,2392 nm
Ala382	0,278 nm	Glu492	0,2796 nm	Ile572	0,4631 nm
Asn383	0,2766 nm	Ala499	0,2203 nm	Lys573	0,4872 nm
Val384	0,2876 nm	Asp500	0,2215 nm	Asp574	0,3551 nm
His390	0,2527 nm	Gly507	0,2591 nm	Leu575	0,2987 nm
Tyr391	0,2422 nm	Thr520	0,2326 nm	Ala576	0,2687 nm
Pro397	0,2557 nm	Ser521	0,2127 nm	Gly579	0,233 nm
Glu398	0,2778 nm	Val522	0,2395 nm	Thr585	0,2898 nm
Leu399	0,2033 nm	Gln523	0,2807 nm	Ser586	0,2503 nm
Asp405	0,2062 nm	Ala524	0,3089 nm	Glu587	0,2168 nm
Arg431	0,2617 nm	Leu525	0,2697 nm	Ala588	0,2222 nm
Thr445	0,2265 nm	Arg526	0,3965 nm	Leu591	0,2026 nm
Lys463	0,2179 nm	Glu527	0,2807 nm	Arg594	0,303 nm
Val464	0,2173 nm	Val528	0,327 nm	Lys598	0,2139 nm
Ile465	0,287 nm	Ile529	0,2777 nm	Asp608	0,343 nm
Glu466	0,2381 nm	Lys530	0,2332 nm		

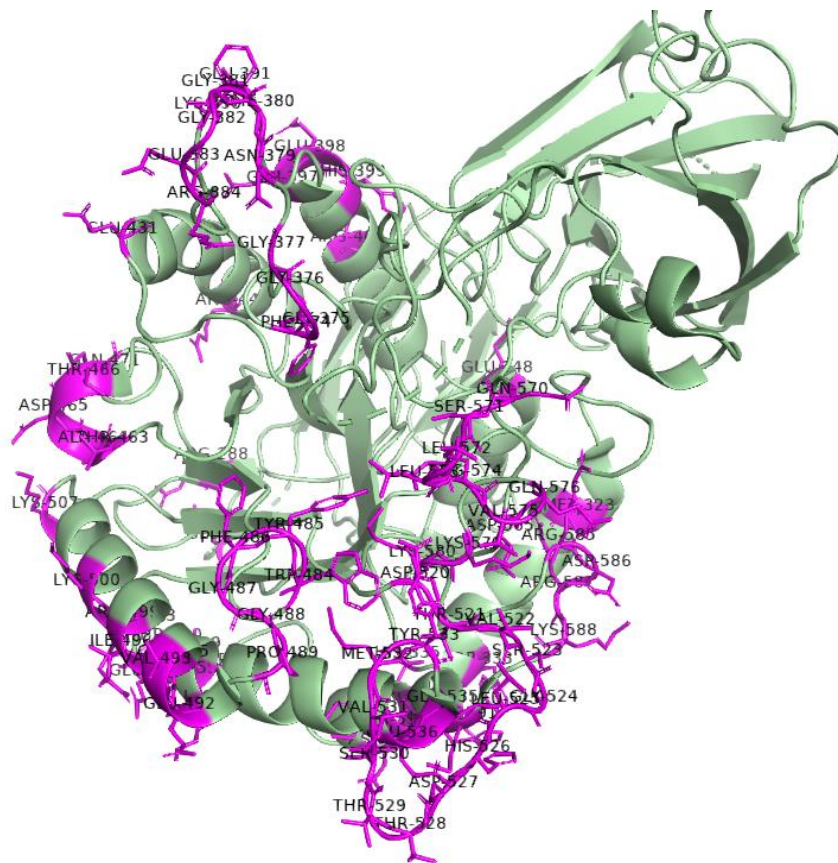


Figura 24. Residuos con alta flexibilidad ($RMSF > 2 \text{ \AA} / 0.2 \text{ nm}$) en el dominio TIM barrel de la β GLU *E. eligens* a pH 3 obtenido en Pymol.

6.4.2.3. Diferencias del SASA de las β GLU *E. eligens* a pH 6.5 y 3

En una simulación de DM de 500,000 ps de duración, apreciamos que los valores del área accesible al solvente son mayores a pH 3 que a pH 6.5 (Figura 25). El SASA promedio, durante la DM de la β GLU *E. eligens* a pH 3, fue mayor (533.3 nm^2) a pH 6.5 (458.2 nm^2). Es decir, durante el tiempo de la DM, la β GLU *E. eligens* tenía más área en contacto con el solvente a pH 3 que a pH óptimo. De la misma manera, el SASA final de la β GLU *E. eligens* a pH 3 fue mayor que al de pH 6.5.

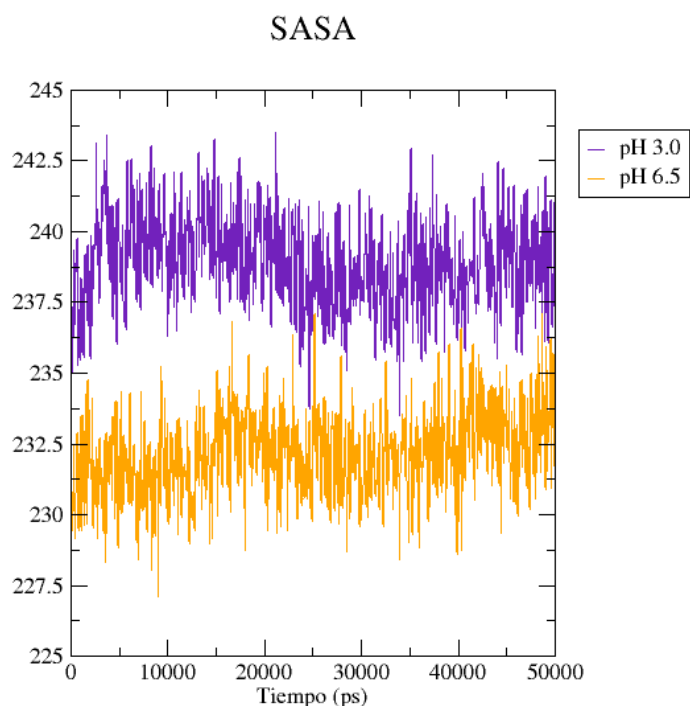


Figura 25. Evolución del SASA de 50 ns de simulación con la β GLU *E. eligens* pH 6.5 y pH 3.

6.4.2.4. Diferencias del Radio de giro de las β GLU *E. eligens* a pH 6.5 y 3

El radio de giro es la distancia que tienen los residuos con el eje de rotación de la enzima, el cual se define según la masa de esta proteína. Este parámetro nos permite monitorear el plegamiento de la proteína.

Al inicio de la DM, antes de los 20000 ps, se observa un aumento del radio de giro, para luego disminuir y mostrar menos variaciones, (después de 20000 ps). El pico máximo

que alcanzó el Radio de giro, a pH 6.5 , fue de 3.25 nm a los 17700 ps, mientras que el pico máximo, a pH 3, fue de 3.28 nm a los 3900 ps (Figura 26). A partir de los 20000 ps, el sistema estabiliza el radio de giro tanto a pH 6.5 (valor promedio 3.20 nm) como a pH 3 (valor promedio de 3.23 nm). Notamos que el Radio de giro de la β GLU *E. eligens* a pH 3 es ligeramente mayor a pH 6.5. Finalmente, al culminar la simulación, el Radio de giro a pH 3 es prácticamente igual que a pH 6.5, con una diferencia de 0.02 nm.

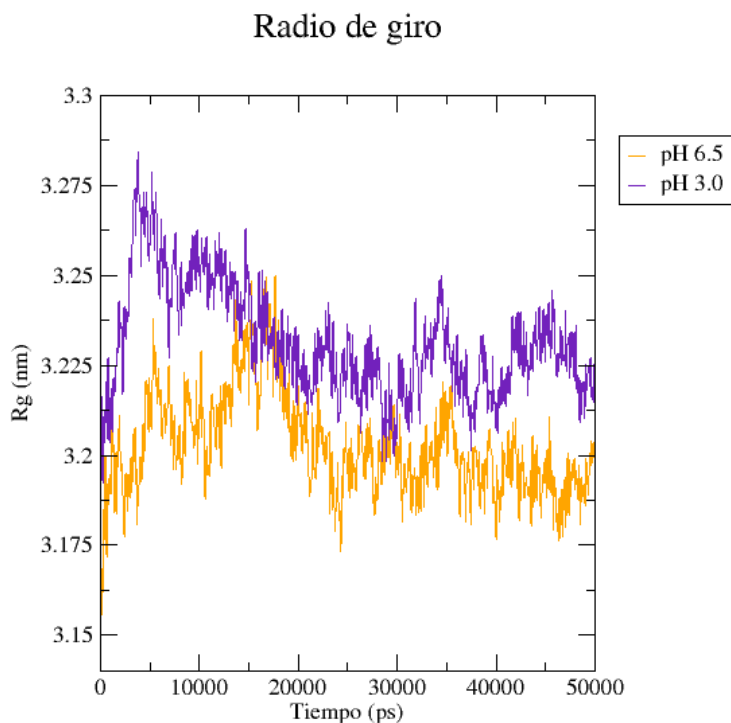


Figura 26. Evolución del Radio de giro de 50 ns de simulación con la β GLU *E. eligens* pH 6.5 y pH 3.

6.4.2.5. Diferencia de los enlaces de Hidrógeno de las β GLU *E. eligens* a pH 6.5 y 3.

Ambas gráficas de la Figura 27 muestran el número de enlaces de hidrógeno a diferentes pH de la β GLU *E. eligens*, además demuestran a simple vista que a pH 6.5 la enzima tiene más enlaces de hidrógeno que a pH 3. Analizamos que el máximo número de enlaces de hidrógeno a pH 6.5 es de 891 a los 12300 ps, mientras a pH 3 fue de 796 a los 0 ps (Figura 27). Este último dato nos indica que durante el resto de la simulación la β GLU *E. eligens* a pH 3 solo ha perdido enlaces de hidrógenos.

También se evaluó el número mínimo de enlaces de hidrógeno, observándose que a pH 6.5 se registró un mínimo de 799, mientras que a pH 3 el mínimo fue de 691. Este valor mínimo de enlaces de hidrógeno a pH 6.5 ($n = 799$) resulta comparable con el valor máximo alcanzado a pH 3 ($n = 796$). En otras palabras, las estructuras simuladas en condiciones de pH ácido y pH óptimo difieren en aproximadamente 100 enlaces de hidrógeno.

El promedio de enlaces de hidrógeno a lo largo de la simulación refuerza esta tendencia: la β GLU *E. eligens* a pH 6.5 presenta un valor medio de 848.18 enlaces, mientras que a pH 3 el promedio desciende a 741.12.

Estos resultados evidencian que el entorno ácido (pH 3) promueve la pérdida de enlaces de hidrógeno, en contraste con el pH 6.5, que conserva un número más elevado de interacciones. La reducción aproximada de 100 enlaces de hidrógeno bajo condiciones ácidas podría comprometer la conformación estructural de la proteína.

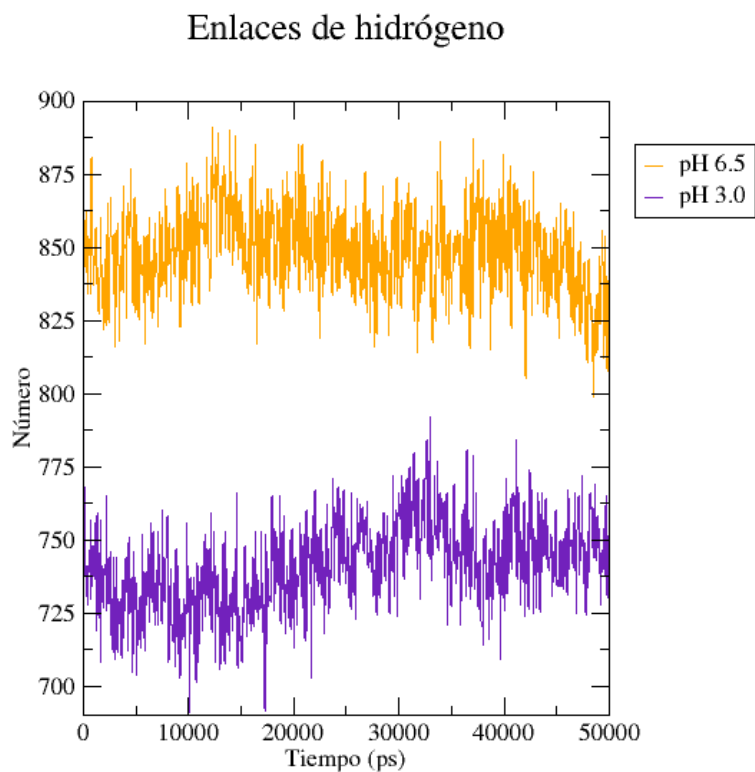


Figura 27. Evolución de Enlaces de hidrógeno de 50 ns de simulación con la β GLU *E. eligens* pH 6.5 y pH 3.

6.4.3 Obtención de Clusters

6.4.3.1 Análisis de las estructuras cluster

Se determinaron los valores de cutoff más adecuados para cada β GLU en función de la distribución de clústeres obtenida a partir del análisis de RMSD. Para cada caso, se aplicó el criterio de seleccionar el menor cutoff que generará un clúster dominante que agrupara al menos el 50% de las estructuras, evitando tanto la sobrefragmentación como la pérdida de información estructural por colapsar todo en un único grupo.

En el caso de la β GLU de *E. coli* a pH 7.4, el cutoff seleccionado fue de 0.12 nm, ya que generó un clúster principal compuesto por 277 estructuras, lo que representa el 69.1 % del total. Este valor cumplió el criterio de dominancia y fue el menor *cutoff* que lo alcanzó. Un valor inferior (0.11 nm) no fue considerado adecuado, ya que el clúster más grande contenía sólo el 29.4 % de las estructuras (118 conformaciones), por debajo del umbral establecido. Por otro lado, valores superiores (entre 0.13 y 0.15 nm), aunque también mostraron clústeres dominantes con más del 50%, tendían a agrupar estructuras diversas en un único grupo, reduciendo la capacidad de diferenciar posibles subestados conformacionales.

Para la β GLU de *E. coli* a pH 3, se seleccionó un cutoff de 0.17 nm. Este valor generó un clúster principal muy dominante que agrupó el 99.25 % de las conformaciones, mientras que los clústeres restantes fueron mínimos, lo que sugiere que podrían representar ruido o transiciones muy breves. Aunque el cutoff de 0.16 nm también mostró un clúster mayoritario (96.76 %), los clústeres menores eran ligeramente más grandes (10 y 3 estructuras), lo cual indicaría una sensibilidad excesiva al separar conformaciones muy similares. Por otro lado, el valor de 0.18 nm unificó todas las estructuras en un único clúster, lo que impide identificar posibles estados alternativos relevantes.

En el caso de la β GLU de *E. eligens* a pH 6.5, se eligió un *cutoff* de 0.16 nm. Este generó un clúster principal que abarcaba más del 70 % de las estructuras (283 conformaciones) y permitió la identificación de tres clústeres adicionales de tamaños moderados (92, 24 y 2 estructuras), lo que indica una buena captura de la diversidad estructural sin fragmentación excesiva. No se seleccionó el valor de 0.15 nm, ya que aunque generaba cinco clústeres, el principal apenas superaba el 50 %. De igual forma, los valores de 0.17

y 0.18 nm fueron descartados, ya que tendían a ocultar posibles subestados minoritarios relevantes al agrupar demasiadas conformaciones en un solo clúster.

Una vez definidos los cutoff óptimos para cada sistema, fue posible identificar las estructuras representativas de la dinámica molecular de cada β GLU. En el caso de la β GLU de *E. coli* a pH 7.4, la estructura representativa correspondió al fotograma ubicado en 35.9 ns de la simulación, mientras que para la misma enzima a pH 3, la estructura seleccionada se encontró en 40.95 ns. En cuanto a la β GLU de *E. eligens*, la conformación representativa a pH 6.5 se extrajo en el tiempo 39.6 ns, y a pH 3, en 42.45 ns. Estas estructuras fueron utilizadas como base para los análisis estructurales comparativos posteriores.

Se realizó el alineamiento estructural de los clústeres catalíticos de las enzimas estudiadas en condiciones de pH óptimo y pH ácido utilizando PyMOL. A partir de esta superposición, se observaron diferencias conformacionales tanto a nivel global como en el entorno del sitio activo.

La superposición de los clústeres de la β GLU de *E. coli* a pH 7.4 (color morado) y pH 3 (color salmón) mostró un RMSD global de 2.820 Å, valor que indica una diferencia estructural moderada, considerando que 1 Ångström (Å) equivale aproximadamente al tamaño de un átomo de hidrógeno. En diversas regiones de la enzima, los pliegues del modelo a pH ácido se posicionaron por encima de los correspondientes a pH neutro, sugiriendo una expansión estructural en el entorno ácido (Figura 28).

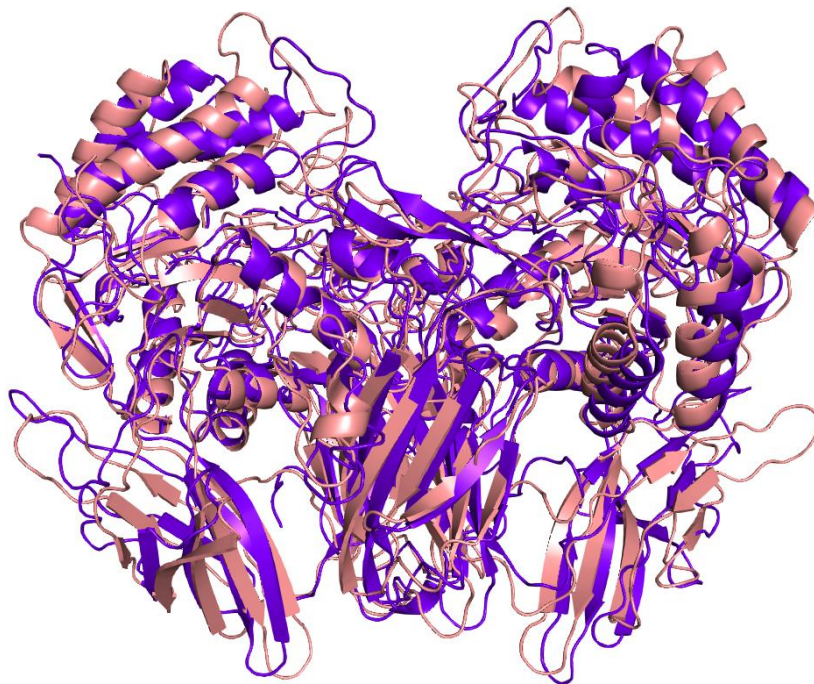


Figura 28. Alineamiento estructural del clúster de la β GLU de *E. coli* a pH 7.4 (color morado) y a pH ácido (color salmón). RMSD = 2.8 Å. Obtenido mediante PyMOL.

Al centrarnos en el sitio activo, se observó que varios bucles del modelo a pH 3 se encuentran desplazados respecto a los del modelo a pH 7.4, los cuales aparecen más compactos (Figura 29). Los residuos del sitio activo fueron representados como sticks verdes para pH 7.4 y sticks rojos para pH 3, mostrando un RMSD del backbone de 2.981 Å, equivalente a casi tres veces la distancia promedio entre átomos de hidrógeno, lo que sugiere un cambio en la orientación de los residuos catalíticos

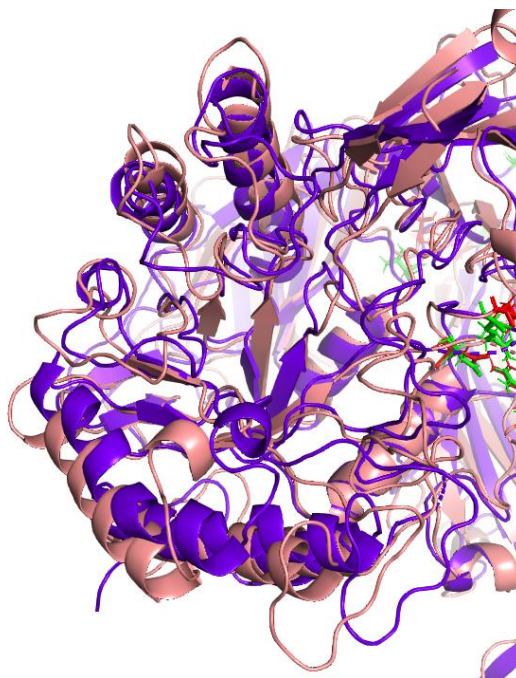


Figura 29. Alineamiento de los bucles de la β GLU de *E. coli* a pH 7.4 (color morado) y a pH 3 (color salm3n). Obtenido mediante PyMOL.

Esta diferencia queda ilustrada en la Figura 30, donde los residuos catal3ticos Glu413 y Glu504 (pH 3, rojo) se encuentran m3s separados respecto a sus equivalentes a pH 7.4 (verde). Otros residuos relevantes que tambi3n mostraron desplazamientos notables fueron Arg562, Tyr472, Glu412, Tyr469 y Asn566, todos alej3ndose del centro del bolsillo catal3tico en condiciones 3cidas.

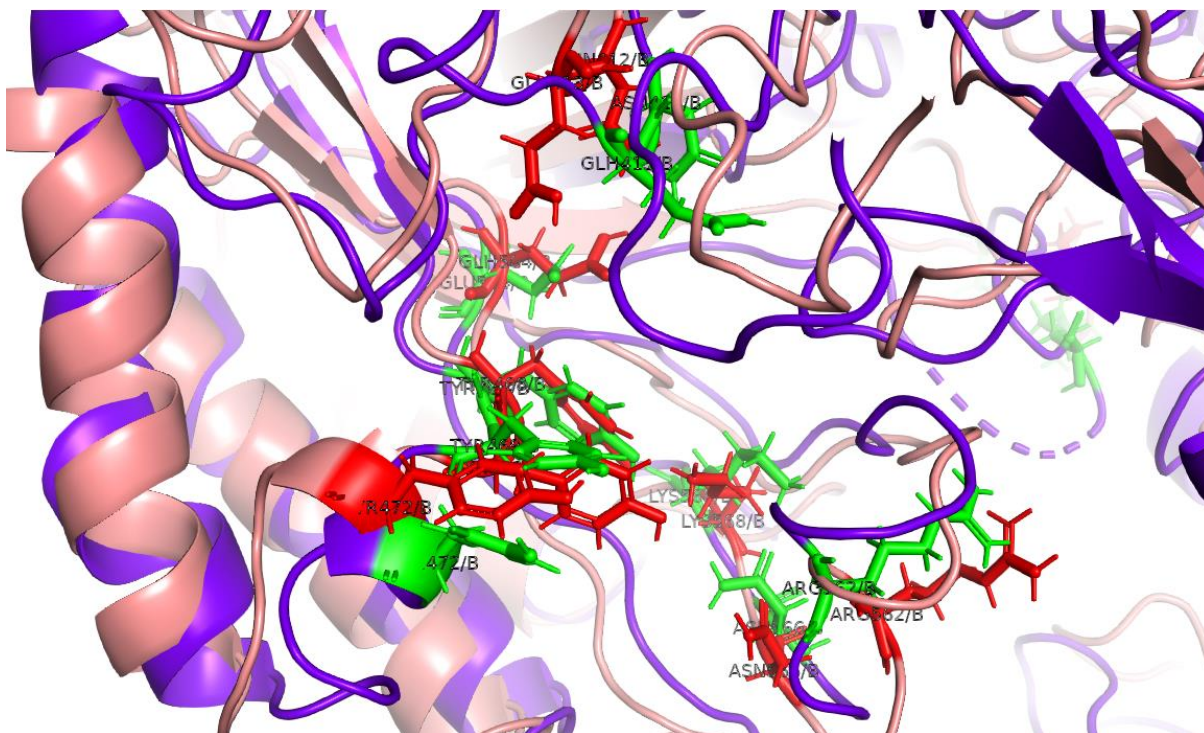


Figura 30. Alineamiento del esqueleto (backbone) de los residuos del sitio activo, resaltados en rojo para el clúster a pH 3 y en verde para el clúster a pH 7.4. RMSD 2.981 Å. Obtenido mediante PyMOL

De forma similar, el alineamiento de los clústeres de la β GLU de *E. eligens* a pH 6.5 (color lemon) y pH 3 (color hot pink) reveló un RMSD global de 3.159 Å, lo que sugiere una variabilidad estructural incluso mayor que la observada para la β GLU de *E. coli*. Se

observaron desplazamientos en diversas regiones estructurales, donde el modelo ácido nuevamente mostró mayor separación en los pliegues (Figura 31).

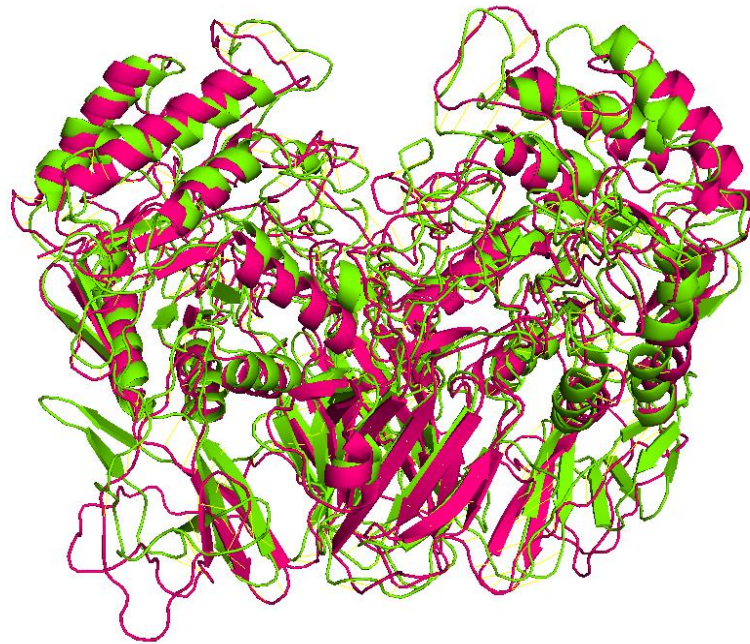


Figura 31. Alineamiento del clúster de la β GLU de *E. eligens* a pH 6.5 (color limón) y a pH ácido (color rosa fuerte). RMSD 3.1 Å. Obtenido mediante PyMOL.

En el entorno del sitio activo (Figura 32), los bucles a pH 3 se posicionaron por encima de los del modelo a pH 6.5, indicando una posible apertura estructural. Los residuos activos se representaron como sticks cian (pH 6.5) y sticks amarillos (pH 3), con un RMSD del backbone de 2.379 Å. Esta diferencia estructural se aprecia en la Figura 33, donde los residuos catalíticos Glu425 y Glu516 (pH 3, amarillo) están visiblemente más alejados de sus contrapartes en pH 6.5 (cian). Además, otros residuos como Asp172, Tyr481, Trp561 y Arg574 también presentaron desplazamientos hacia fuera del centro catalítico en condiciones ácidas.

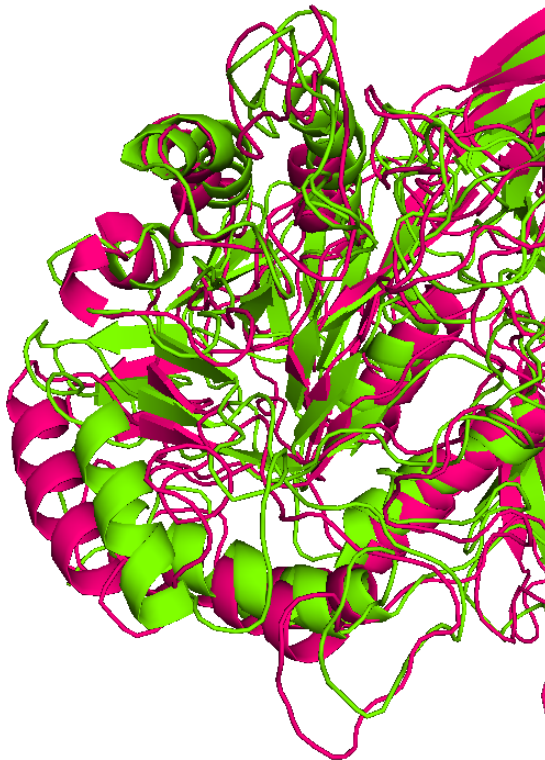


Figura 32. Alineamiento de los bucles de 1 β GLU de *E. eligens* a pH 6.5 (color lemon) y a pH 3 (color hot pink). Obtenido mediante PyMOL

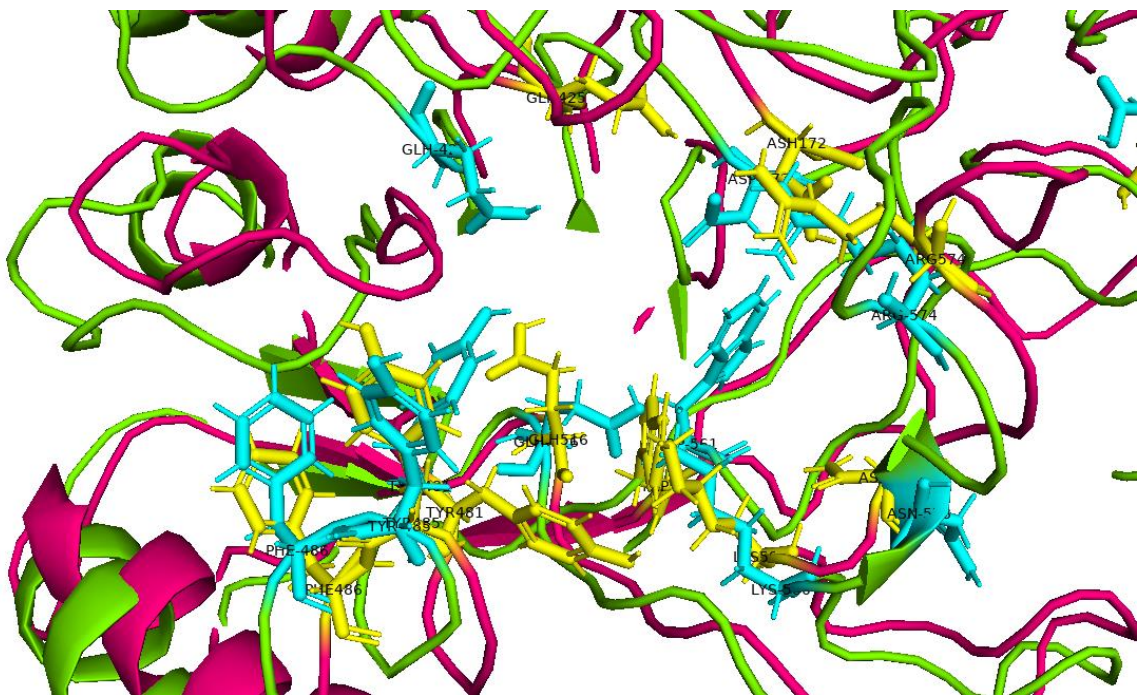


Figura 33. Alineamiento del esqueleto (backbone) de los residuos del sitio activo, resaltados en amarillo para el clúster a pH 3 y en cian para el clúster a pH 6.5. RMSD 2.379 Å. Obtenido mediante PyMOL.

6.4.3.2 Cargas de los residuos cluster

Al comparar las cargas, unidades e carga elemental (e), de los 601 residuos del cluster β GLU *E.coli* entre pH 7.4 y pH 3.0, identificamos 76 residuos con una variación de carga superior a 0.005, la mayoría correspondientes a aminoácidos cargados (sensibles al pH) como Glu, Asp e His (Tabla 12). Entre estos residuos, solo Glu413, localizado en el sitio activo, presentó un cambio significativo en su carga (>0.005). Los demás residuos del sitio activo y la zona de homodimerización mostraron variaciones menores (Tabla 13), pero su análisis estructural reveló que se encuentran rodeados por residuos con alteraciones marcadas en su carga.

Tabla 12. Cargas (e) de los residuos del cluster β GLU (*E. coli*) a pH 7.4 y pH 3.0

Residuo	pH 7.4	pH 3.0	Variación	Residuo	pH 7.4	pH 3.0	Variación
Glu 6	-0.051	-0.01	0.041	Asp 300	-0.053	-0.136	0.083
Lys 14	0.038	0.077	0.039	His 313	-0.052	-0.009	0.043
Glu26	-0.05	-0.01	0.040	Asp 314	-0.051	-0.136	0.085
Asp 31	-0.052	-0.136	0.084	Asp 319	-0.052	-0.136	0.084
Glu36	-0.051	-0.011	0.040	Glu336	-0.051	-0.008	0.043
Glu 41	-0.051	-0.01	0.041	Asp 339	-0.051	-0.136	0.085
Asp 53	-0.052	-0.136	0.084	Asp 342	-0.053	-0.136	0.083
Asp 57	-0.052	-0.136	0.084	Glu 343	-0.05	-0.012	0.038
Asp 59	-0.052	-0.136	0.084	His 344	-0.05	-0.011	0.039
Glu 72	-0.051	-0.012	0.039	Glu 373	-0.052	-0.011	0.041
Asp 89	-0.052	-0.136	0.084	Glu 377	-0.051	-0.01	0.041
His 93	-0.242	-0.012	0.230	Glu 378	-0.05	-0.011	0.039
Glu 103	-0.05	-0.01	0.04	Glu 383	-0.05	-0.011	0.039
Glu 106	-0.052	-0.009	0.043	His 388	-0.051	-0.01	0.041
His 107	-0.242	-0.01	0.232	Glu 394	-0.051	-0.01	0.041
Glu 115	-0.053	-0.01	0.043	Glu 413	-0.05	-0.011	0.039
Asp 117	-0.05	-0.136	0.086	Asp 415	-0.051	-0.136	0.085
Glu 137	-0.05	-0.011	0.039	Glu 423	-0.05	-0.01	0.040
Glu 152	-0.053	-0.009	0.044	Asp 24	-0.051	-0.136	0.085
Asp 163	-0.051	-0.136	0.085	Glu 430	-0.052	-0.01	0.042
Asp 185	-0.051	-0.136	0.085	His 452	-0.049	-0.01	0.039
Asp 186	-0.052	-0.136	0.084	Asp 454	-0.05	-0.136	0.086
His 192	-0.051	-0.011	0.040	Asp 461	-0.051	-0.136	0.085
Asp 196	-0.052	-0.136	0.084	Glu 479	-0.051	-0.011	0.040
His 199	-0.242	-0.009	0.233	Glu 486	-0.05	-0.009	0.041
Asp 203	-0.053	-0.136	0.083	Glu 488	-0.051	-0.011	0.040

Asp 211	-0.051	-0.136	0.085	Glu 494	-0.053	-0.011	0.042
Glu 215	-0.05	-0.011	0.039	His 497	-0.05	-0.009	0.041
Asp 220	-0.052	-0.136	0.084	His 514	-0.051	-0.007	0.044
His 240	-0.242	-0.009	0.233	Asp 519	-0.051	-0.136	0.085
Glu 246	-0.051	-0.012	0.039	Glu 524	-0.051	-0.011	0.040
Glu 251	-0.052	-0.01	0.042	Trp 529	-0.021	-0.027	0.006
Glu 261	-0.052	-0.011	0.041	Asp 531	-0.054	-0.136	0.082
Asp 263	-0.052	-0.136	0.084	Asp 538	-0.052	-0.136	0.084
Glu 279	-0.051	-0.009	0.042	Glu 546	-0.051	-0.011	0.040
His 285	-0.05	-0.007	0.043	Asp 553	-0.051	-0.136	0.085
Glu 297	-0.051	-0.011	0.040	Asp 574	-0.051	-0.136	0.085
Asp 298	-0.051	-0.136	0.085	Glu 595	-0.052	-0.011	0.041

Tabla 13. Variación de carga (e) en residuos del sitio activo y zona de homodimerización del cluster β GLU (*E. coli*) a pH 7.4 y pH 3.0.

Grupo	Residuo	pH 7.4	pH 3.0	Variación
Residuos del sitio activo	Asn 412	0.016	0.017	0.001
	Tyr 468	0.004	0.003	0.001
	Tyr 469	0.004	0.002	0.002
	Tyr 472	0.004	0.004	0.000
	Glu 504	-0.01	-0.01	0.000
	Arg 562	0.076	0.074	0.002
	Asn 566	0.016	0.018	0.002
	Lys 568	0.078	0.077	0.001
Residuos de la zona de homodimerización	Lys 77	0.078	0.077	0.001
	Arg 302	0.076	0.075	0.001
	Asp 307	-0.052	-0.051	0.001
	Thr 7	0.01	0.008	0.002

En la estructura 3D del cluster β GLU (Figura 34A), los residuos con variaciones superiores a 0.005 (representados en rojo) se distribuyeron cerca del sitio activo y la interfaz de homodimerización. Por ejemplo, Asn412 (verde), un residuo del sitio activo, se localizó adyacente a Glu413 (rojo), el cual experimentó un cambio notable en su carga (Figura 34B). Asimismo, los residuos de Tyr472, Arg562, Lys568 y Asn566 (verde) aparecieron próximos a residuos como Trp529, Glu297 y Glu413 (rojos), que mostraron

variaciones significativas (Figura 34C). En la zona de homodimerización, Arg302 y Asp307 (verde) estuvieron cercanos a Asp300 y Asp574 (rojos), residuos que también exhibieron cambios importantes en su carga (Figura 34D).

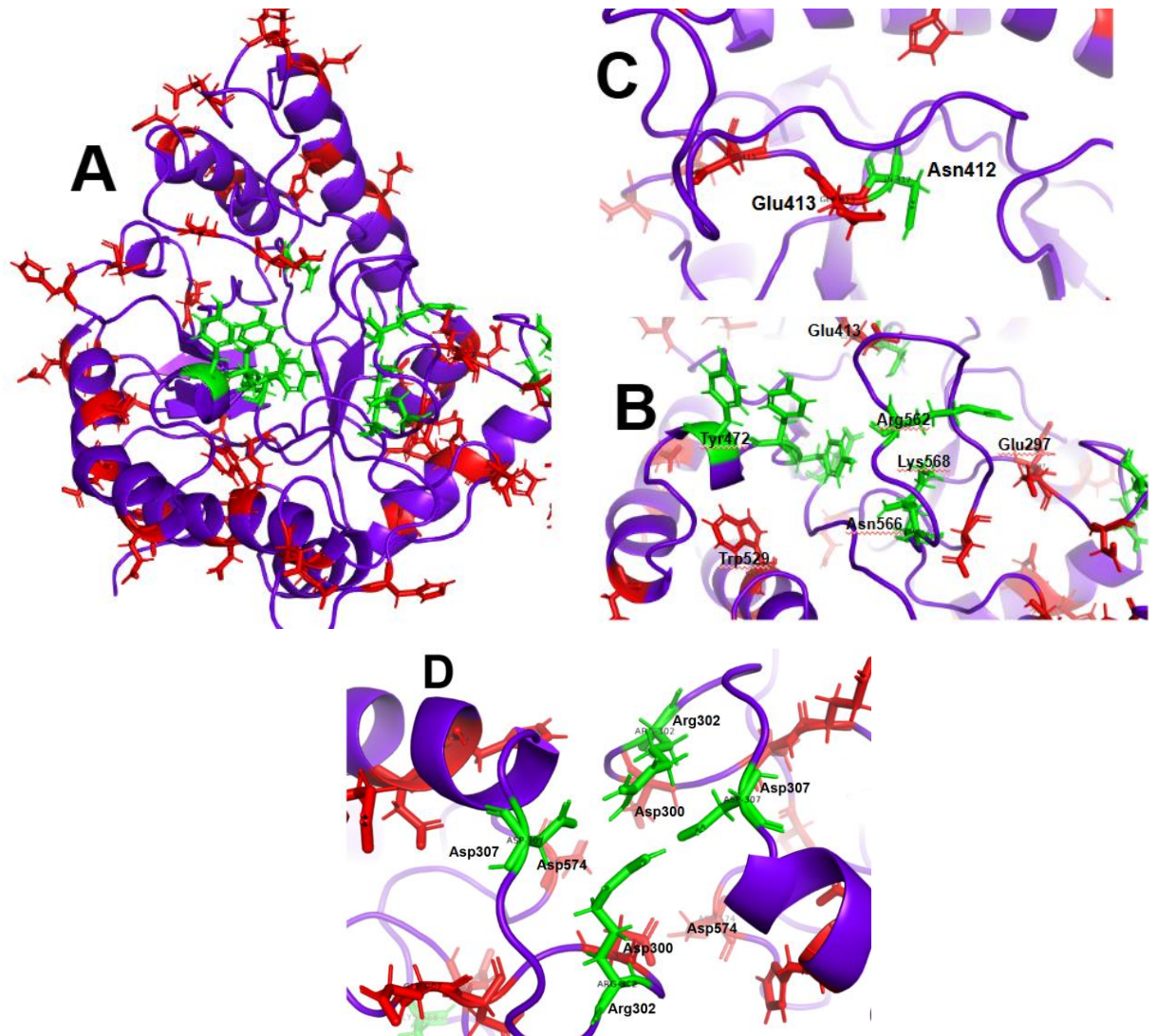


Figura 34. Distribución espacial de residuos con cambios de carga en el cluster β GLU (*E. coli*). A) Vista general del sitio activo. B) Asn412 (verde) y Glu413 (rojo). C) Tyr472, Arg562, Lys568 y Asn566 (verde) cerca de residuos con cambios marcados (rojos). D) Interfaz de homodimerización con Arg302, Asp307 (verde) y residuos adyacentes Asp300 y Asp574 (rojos). Obtenido mediante PyMOL.

Al comparar las cargas electrostáticas (e) de los 610 residuos del cluster β GLU *E. eligens* entre pH 6.5 y pH 3.0, identificamos 84 residuos con una variación de carga superior a

0.005, la mayoría correspondientes a aminoácidos sensibles al pH como Glu, Asp e His (Tabla 14). Entre estos, sólo Asp 172 localizado en el sitio activo presentó un cambio significativo en su carga (>0.005) y Glu357, Asp125, Glu55, Asp14, en la zona de homodimerización. Los demás residuos del sitio activo y la zona de homodimerización mostraron variaciones menores (Tabla 15), pero su análisis estructural reveló que se encuentran rodeados por residuos con alteraciones marcadas en su carga.

Tabla 14. Cargas (e) de los residuos del cluster β GLU (*E. eligens*) a pH 6.5 y pH 3.0.

Residuo	pH 6.5	pH 3.0	Variación	Residuo	pH 6.5	pH 3.0	Variación
Arg 10	0.071	0.076	0.005	Asp 355	-0.054	-0.136	0.082
Trp 19	-0.029	-0.024	0.005	Glu 364	-0.053	-0.009	0.044
Asp 20	-0.053	-0.136	0.083	Glu 383	-0.053	-0.011	0.042
Asp 24	-0.055	-0.136	0.081	Asp 389	-0.053	-0.136	0.083
Glu 30	-0.053	-0.01	0.043	Glu 391	-0.054	-0.01	0.044
Glu 31	-0.051	-0.01	0.041	His 392	-0.053	-0.009	0.044
Trp 33	-0.028	-0.023	0.005	Glu 398	-0.053	-0.01	0.043
Glu 35	-0.052	-0.01	0.042	His 399	-0.052	-0.008	0.044
Asp 40	-0.053	-0.136	0.083	His 400	-0.248	-0.01	0.238
Asp 42	-0.054	-0.136	0.082	Asp 402	-0.053	-0.136	0.083
His 62	-0.05	-0.01	0.040	Asp 406	-0.053	-0.136	0.083
Tyr 68	-0.001	0.004	0.005	Asp 427	-0.053	-0.136	0.083
Arg 82	0.071	0.076	0.005	Glu 431	-0.052	-0.01	0.042
His 92	-0.248	-0.009	0.239	Asp 435	-0.054	-0.136	0.082
Glu 105	-0.052	-0.012	0.040	Asp 442	-0.051	-0.136	0.085
His 106	-0.053	-0.01	0.043	Glu 446	-0.053	-0.01	0.043
Glu 114	-0.053	-0.01	0.043	Asp 465	-0.051	-0.136	0.085
Glu 116	-0.054	-0.01	0.044	Asp 467	-0.052	-0.136	0.084
Asp 119	-0.053	-0.136	0.083	Glu 471	0.015	0.02	0.005
Asp 120	-0.052	-0.136	0.084	Asp 474	-0.052	-0.136	0.084
Met 150	0.021	0.026	0.005	Asp 490	-0.053	-0.136	0.083
Glu 190	-0.052	-0.012	0.040	Glu 492	-0.052	-0.012	0.040
Asp 195	-0.053	-0.136	0.083	Glu 495	-0.054	-0.01	0.044
Asp 203	-0.052	-0.136	0.084	Arg 499	0.07	0.075	0.005
Glu 218	-0.053	-0.009	0.044	Glu 501	-0.052	-0.011	0.041
Asp 235	-0.053	-0.136	0.083	Asp 504	-0.054	-0.136	0.082
Glu 236	-0.052	-0.01	0.042	Asp 520	-0.054	-0.136	0.082
Glu 237	-0.052	-0.01	0.042	His 526	-0.006	-0.011	0.005
Lys 240	0.074	0.079	0.005	Asp 527	-0.054	-0.136	0.082
Glu 243	-0.053	-0.011	0.042	Glu 535	-0.054	-0.01	0.044
Glu 252	-0.054	-0.011	0.043	Glu 536	-0.052	-0.01	0.042
Asp 290	-0.053	-0.136	0.083	Glu 540	-0.052	-0.009	0.043

Glu 298	-0.051	-0.01	0.041	Glu 543	-0.053	-0.011	0.042
Glu 310	-0.052	-0.01	0.042	Lys 547	0.075	0.08	0.005
Asp 327	-0.051	-0.136	0.085	Asp 550	-0.055	-0.136	0.081
His 335	-0.053	-0.01	0.043	Glu 551	-0.054	-0.01	0.044
His 343	-0.051	-0.009	0.042	Asp 553	-0.053	-0.136	0.083
Glu 348	-0.053	-0.012	0.041	Asp 565	-0.054	-0.136	0.082
Glu 349	-0.052	-0.01	0.042	Asp 586	-0.053	-0.136	0.083
Arg 352	0.072	0.077	0.005	His 594	-0.053	-0.009	0.044

Tabla 15. Variación de carga (e) en residuos del sitio activo y zona de homodimerización del cluster β GLU (*E. eligens*) a pH 6.5 y pH 3.0.

Grupo	Residuo	pH 6.5	pH 3.0	Variación
Residuos del sitio activo	Asp 172	-0.054	-0.136	0.082
	Glu 425	-0.011	-0.011	0.000
	Tyr 481	0.001	0.003	0.002
	Phe 486	0.002	0.006	0.004
	Glu 516	-0.011	-0.011	0.000
	Trp 561	-0.029	-0.025	0.004
	Arg 574	0.072	0.074	0.002
	Asn 578	0.015	0.017	0.002
	Lys 580	0.077	0.076	0.001
Residuos de la zona de homodimerización	Asp 14	-0.052	-0.136	0.084
	Leu 12	0.008	0.01	0.002
	Thr 43	0.007	0.008	0.001
	Ash 52	-0.14	-0.136	0.004
	Glu 55	-0.053	-0.011	0.042
	Glu 357	-0.053	-0.01	0.043
	Ly 326	0.076	0.078	0.002
	Lys 270	0.075	0.079	0.004
Asp 125	-0.053	-0.136	0.083	

En la estructura 3D del cluster β GLU *E. eligens* (Figura 35), los residuos con variaciones superiores a 0.005 (representados en amarillo) se distribuyeron cerca del sitio activo (Figura 35A) y la interfaz de homodimerización. Por ejemplo, Glu425(amarillo), un residuo del sitio activo, se localizó adyacente a Asp427(cyan), el cual experimentó un cambio notable en su carga. Asimismo, Thr 561, Asp172, Arg574, Asn578 y Phe486 (amarillo) aparecieron próximos a residuos como Asp427, Glu364, His343, Asp520, Glu501 y Asp565 (cyan), que mostraron variaciones significativas (Figura 35B). En la zona de homodimerización, Leu12, Thr43, Asp125, Lys270 y Lys326 (amarillo) estuvieron cercanos a Arg10, Asp42, Trp 19 y Lys 327 (cyan), residuos que también exhibieron cambios importantes en su carga (Figura 35C y D).

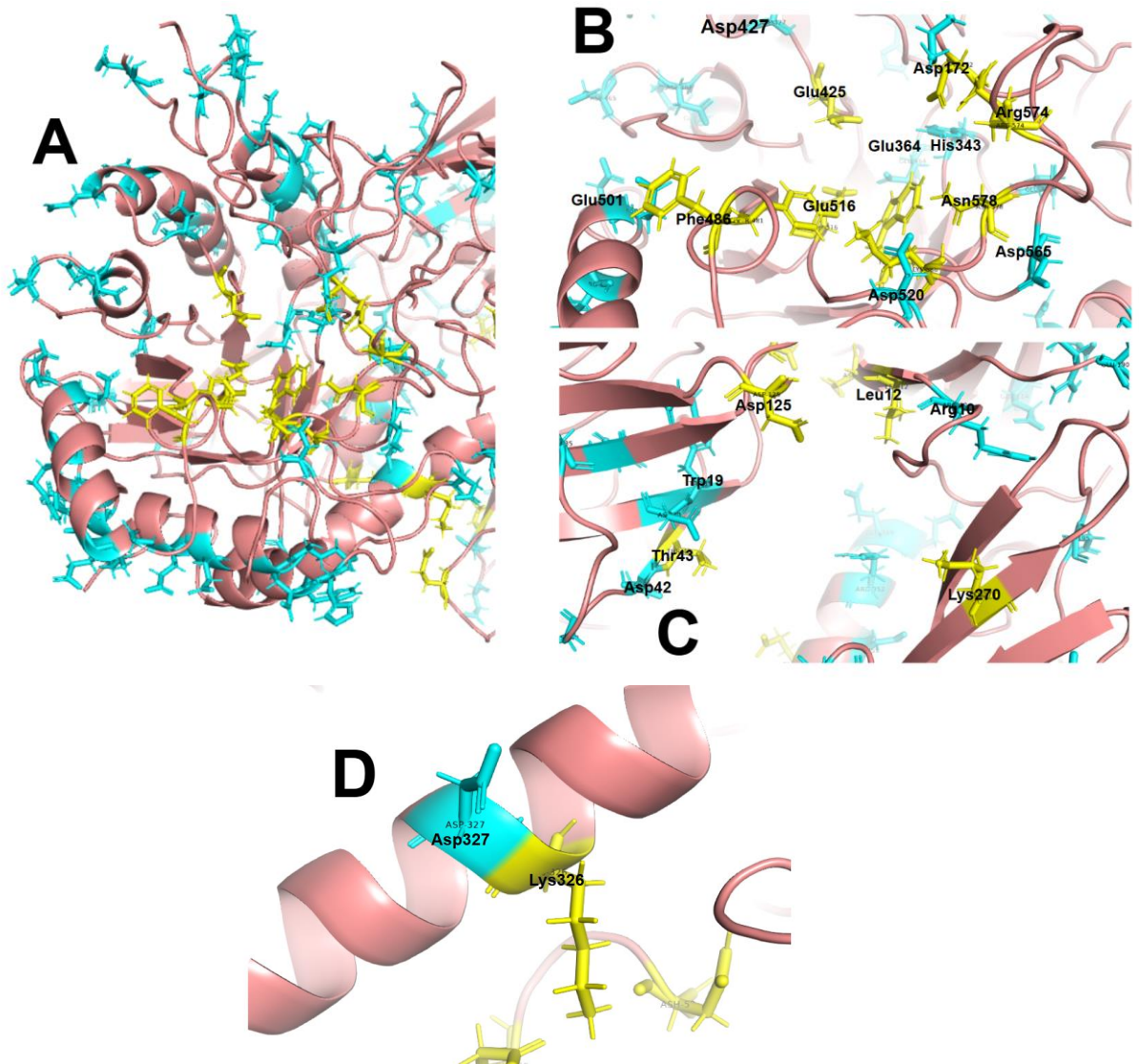


Figura 35. Estructura 3D del cluster β GLU de *E. eligens* mostrando la distribución de residuos con variación de carga >0.005 (amarillo) y residuos relevantes del entorno (cian). En (A) se observa la disposición general cerca del sitio activo, Los paneles (B) muestran interacciones clave como Thr561, Asp172, Arg574, Asn578 y Phe486 (amarillo) con residuos circundantes (Asp427, Glu364, His343, Asp520, Glu501 y Asp565 en cian), mientras (C-D) revelan la zona de homodimerización con Leu12, Thr43, Lys270 y Lys326 (amarillo) asociados a Arg10, Asp42, Trp19 y Lys327(cian), evidenciando cómo los cambios de carga se agrupan espacialmente en regiones funcionales. Obtenido mediante PyMOL.

6.4.4 Comparación RMSD y potencial electrostático del control positivo

Para asegurar la robustez del método de DM, en este estudio se usó un control positivo de los ensayos de DM. Se seleccionó la enzima aminotransferasa de aspartato mitocondrial ya que cumple con las características deseadas: posee un tamaño comprendido entre 400 y 600 residuos, similar al de la β GLU en estudio (600 aa), y cuenta con estructuras resueltas tanto en su pH óptimo como en condiciones ácidas. Estos criterios, previamente establecidos en la sección 5.6.2 de Metodología, fueron fundamentales para su elección. La aminotransferasa de aspartato mitocondrial del organismo *Gallus Gallus*, la cual consta de 401 residuos y tiene una estructura de dímero y presentaba las estructuras resueltas a pH 7.5 (PDB 7AAT) y a pH ácido de 5.1 (PDB 8AAT).

Luego de realizar la simulación de dinámica molecular (DM) en WebGro, se ingresaron los archivos necesarios para extraer los clusters de la enzima 7AAT simulada a pH 5.1. Este cluster fue abierto en PyMOL, donde también se cargó la estructura de la proteína 8AAT, previamente resuelta experimentalmente a pH 5.1. Ambas estructuras, el cluster de la 7AAT simulada a pH ácido y la 8AAT determinada a pH 5, fueron alineadas, obteniéndose un valor de RMSD de 0.956 (Figura 36), lo que indica un buen nivel de similitud estructural entre la proteína simulada y la real en condiciones de pH ácido. Posteriormente, el análisis se centró en el potencial electrostático de la aminotransferasa de aspartato mitocondrial (PDB 7AAT, determinada a pH neutro pero simulada a pH 5.1), el cual mostró una distribución de cargas similar a la de la misma enzima resuelta experimentalmente a pH ácido (PDB 8AAT). Las Figuras 37A y 375B ilustran las zonas

cargadas positivamente, mientras que las Figuras 37C y 35D muestran las regiones negativas en el lado anterior de la proteína. De manera análoga, en el lado posterior también se observaron similitudes en la localización de cargas positivas (Figuras 38A y 38B) y negativas (Figuras 38C y 38D). Aunque ambas estructuras presentan cargas en las mismas regiones funcionales, se aprecian ligeras diferencias en la intensidad de las coloraciones, lo que sugiere variaciones en la magnitud de las cargas. No obstante, la coincidencia espacial de estas zonas electrostáticas clave refuerza la validez del modelo simulado. Finalmente, al comparar los rangos de potencial electrostático, la 7AAT mostró un intervalo de -70.319 a 70.319, mientras que la 8AAT experimental presentó un rango de -76.563 a 76.563, lo que representa una diferencia relativa del 8.16% entre ambas estructuras.

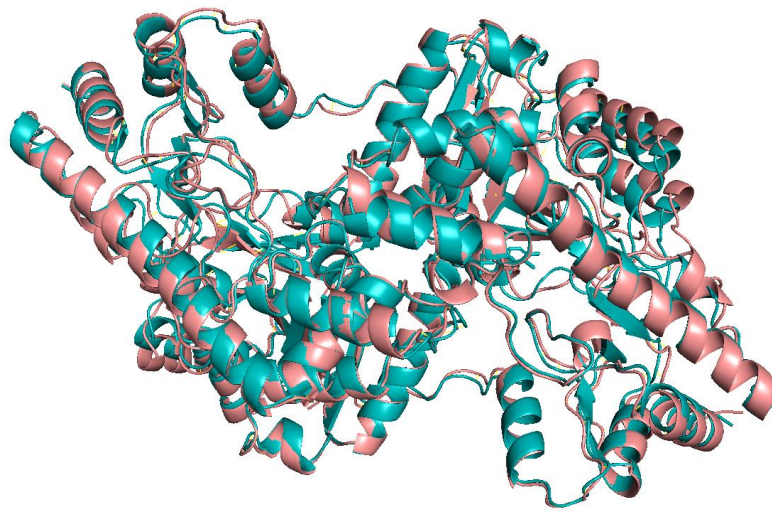


Figura 36. Alineamiento estructural de la enzima 7AAT de color salmón (simulada a pH 5.1) y la 8AAT de color celeste (determinada experimentalmente a pH 5.1), obtenida mediante PyMOL. El alineamiento mostró un RMSD de 0.956 Å, indicando una alta similitud entre ambas conformaciones.

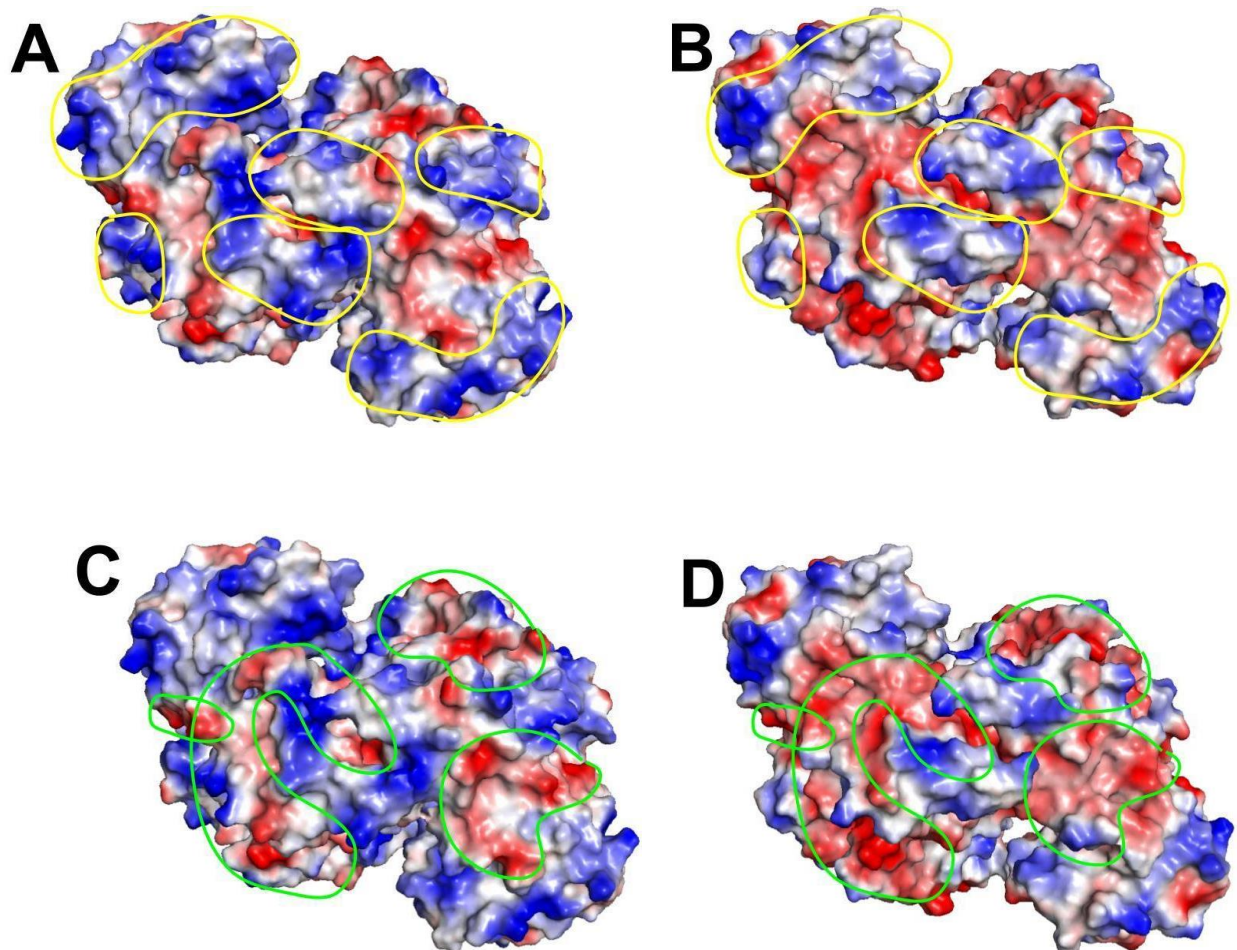


Figura 37. Distribución de potencial electrostático en PyMOL.(A) 7AAT (pH ácido), región anterior: cargas positivas (contornos amarillos).(B) 8AAT (pH 5.1), región anterior: cargas positivas (contornos amarillos).(C) 7AAT (pH ácido), región anterior: cargas negativas (contornos verdes).(D) 8AAT (pH 5.1), región anterior: cargas positivas (contornos amarillos).

*Las zonas demarcadas muestran conservación de cargas entre 7AAT (simulada a pH 5.1) y 8AAT (resuelta a pH 5.1)

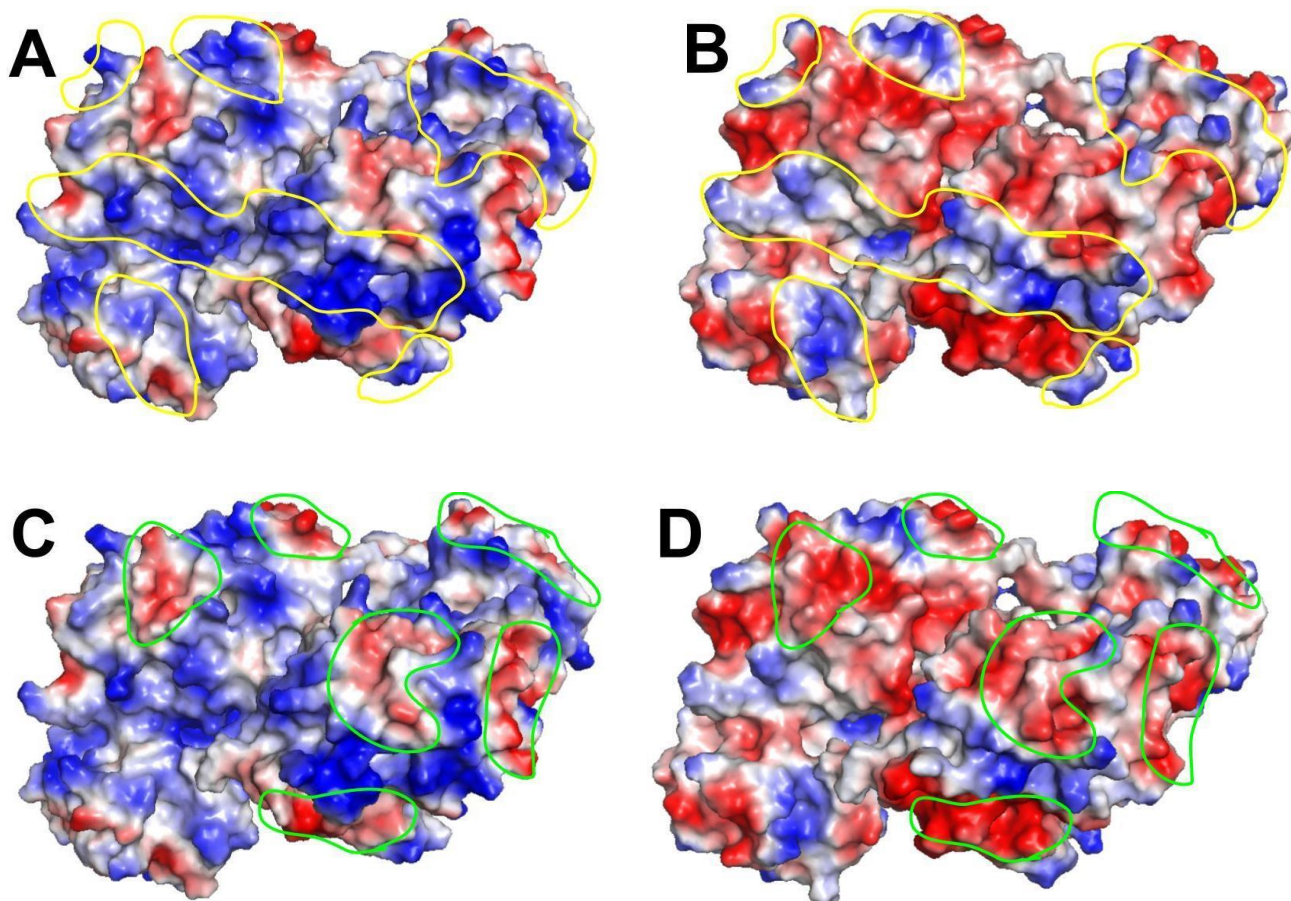


Figura 38. Distribución de potencial electrostático en PyMOL.(A) 7AAT (pH ácido), región posterior: cargas positivas (contornos amarillos).(B) 8AAT (pH 5.1), región posterior: cargas positivas (contornos amarillos).(C) 7AAT (pH ácido), región posterior: cargas negativas (contornos verdes).(D) 8AAT (pH 5.1), región posterior: cargas positivas (contornos amarillos).

*Las zonas demarcadas muestran conservación de cargas entre 7AAT (simulada a pH 5.1) y 8AAT (resuelta a pH 5.1)

6.5 Predicción de bolsillos de unión

6.5.1 β GLU de *E. coli*

Para investigar cambios conformacionales debido al efecto del pH, en el bolsillo de unión (sitio activo), lugar donde se lleva a cabo la catálisis del ácido glucurónico del metabolito inactivo SN38-G en las β GLU de *E. eligens* y *E. coli*, se empleó Fpocket, el cual analizó las estructuras resultantes de la DM. El bolsillo de unión fue reconocido por inspección visual de la estructura la β GLU *E. coli* en complejo resuelto con el ácido glucurónico

(código PDB: 3K4D) el cual sirvió de control. Así observamos que el bolsillo de unión de la β GLU de *E. coli* a pH 7.4 (Figura 39A) presenta un volumen de 897.9 \AA^3 y un SASA de 264.238 \AA^2 , mientras que a pH 3 (Figura 39D) fue más grande, con un volumen de 990.7 \AA^3 y un SASA de 291.509 \AA^2 . Este resultado muestra que el espacio o cavidad del sitio activo de la β GLU de *E. coli* aumenta al simular un ambiente ácido. Dado que el programa predijo varios sitios o bolsillos, para seleccionar entre los diferentes cálculos de bolsillos generados por el programa, nos basamos visualmente en la estructura de la misma enzima en complejo con ácido glucurónico (3K4D, Figura 39C y 39E), así como en la estructura de cluster obtenida después de su evaluación a pH específico deseado (Figura 39B y 39E).

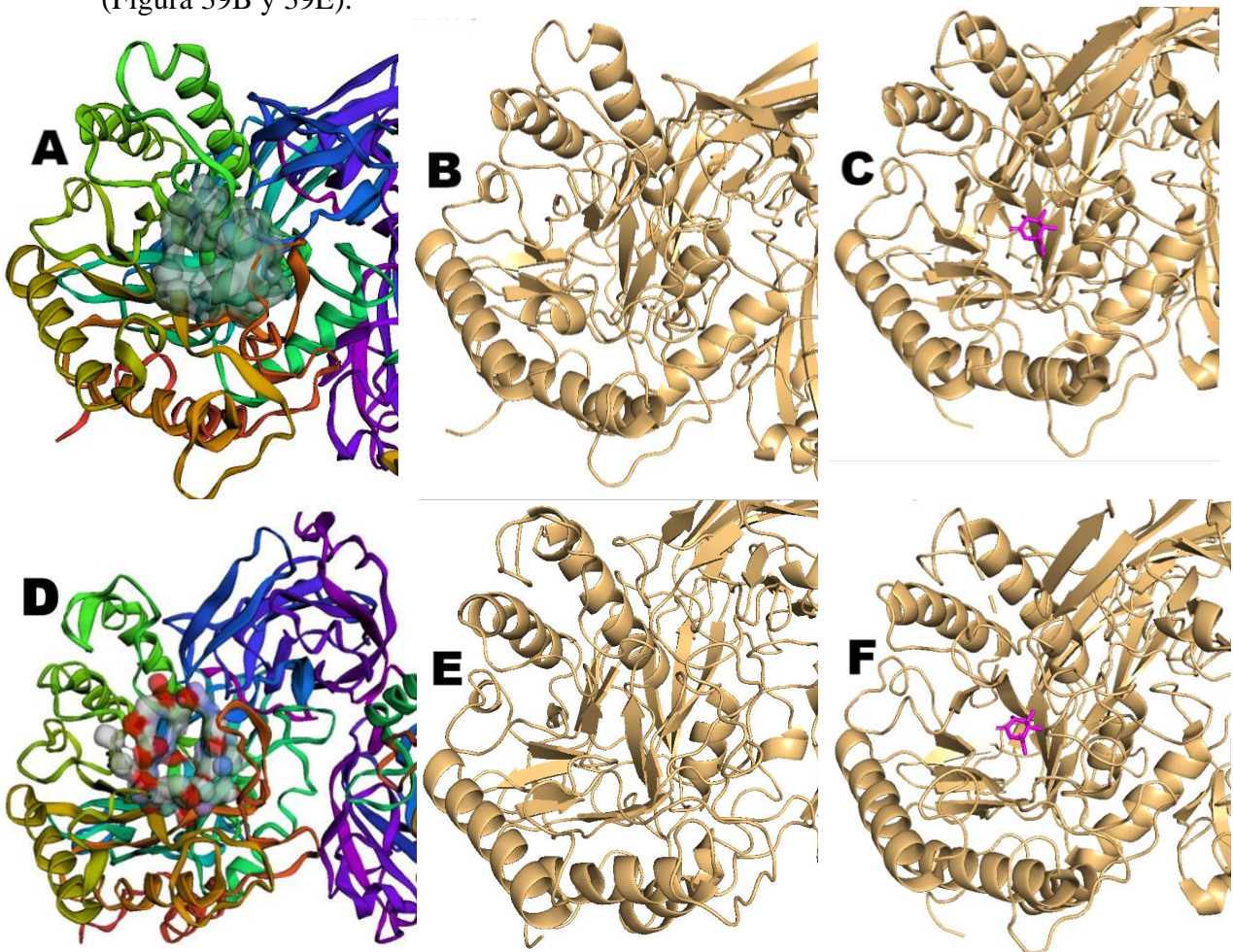


Figura 39. Predicción de bolsillo de unión en la β GLU *E. coli* a diferentes pHs, obtenido por Fpocket (A) Área del bolsillo calculado (gris) a pH 7.4 . (B) Conformación del sitio activo del cluster de la β GLU *E. coli* pH 7.4 (C) β GLU *E. coli* en complejo con glucaro- δ -lactama (PDB: 3K4D) en la misma orientación (D) Área del bolsillo calculado (Surface de color blanco, rojo y azul) a pH 3.0. (E) Conformación del sitio activo del cluster de la

β GLU *E. coli* pH 3.0. (F) β GLU *E. coli* en complejo con glucaro- δ -lactama (PDB: 3K4D) en la misma orientación.

6.5.2 β GLU de *E. eligens*

Para investigar posibles cambios en el bolsillo de unión (sitio activo), se empleó Fpocket utilizando las estructuras resultantes de la DM. El bolsillo de unión fue reconocido por inspección visual de la estructura la β GLU *E. eligens* en complejo resuelto con el ácido glucurónico (código PDB: 6BJQ) el cual sirvió de control. Así observamos que, a pH 6.5 (Figura 40A), el bolsillo de unión de la β GLU de *E. eligens* presenta un volumen de 313.0 \AA^3 y un SASA de 133.733 \AA^2 , mientras que a pH 3 (Figura 40B) el volumen se agrandó más del doble (871 \AA^3) y también incrementó el SASA (216.816). Este hallazgo demuestra que el espacio o cavidad correspondiente al sitio activo de la β GLU de *E. eligens* experimenta un incremento en su tamaño a un pH de 6.5. Este fenómeno se acentúa cuando el medio se acidifica, observándose un comportamiento similar al reportado previamente para la β GLU de *E. coli* (sección 6.6.1). Dado que el programa predijo varios sitios o bolsillos, para seleccionar entre los diferentes cálculos de bolsillos generados por el programa, nos basamos visualmente en la estructura de la misma enzima en complejo con ácido glucurónico (6BJQ, Figura 40C y 40F), así como en la estructura de cluster obtenida después de su evaluación a pH específico deseado (Figura 40B y 40E).

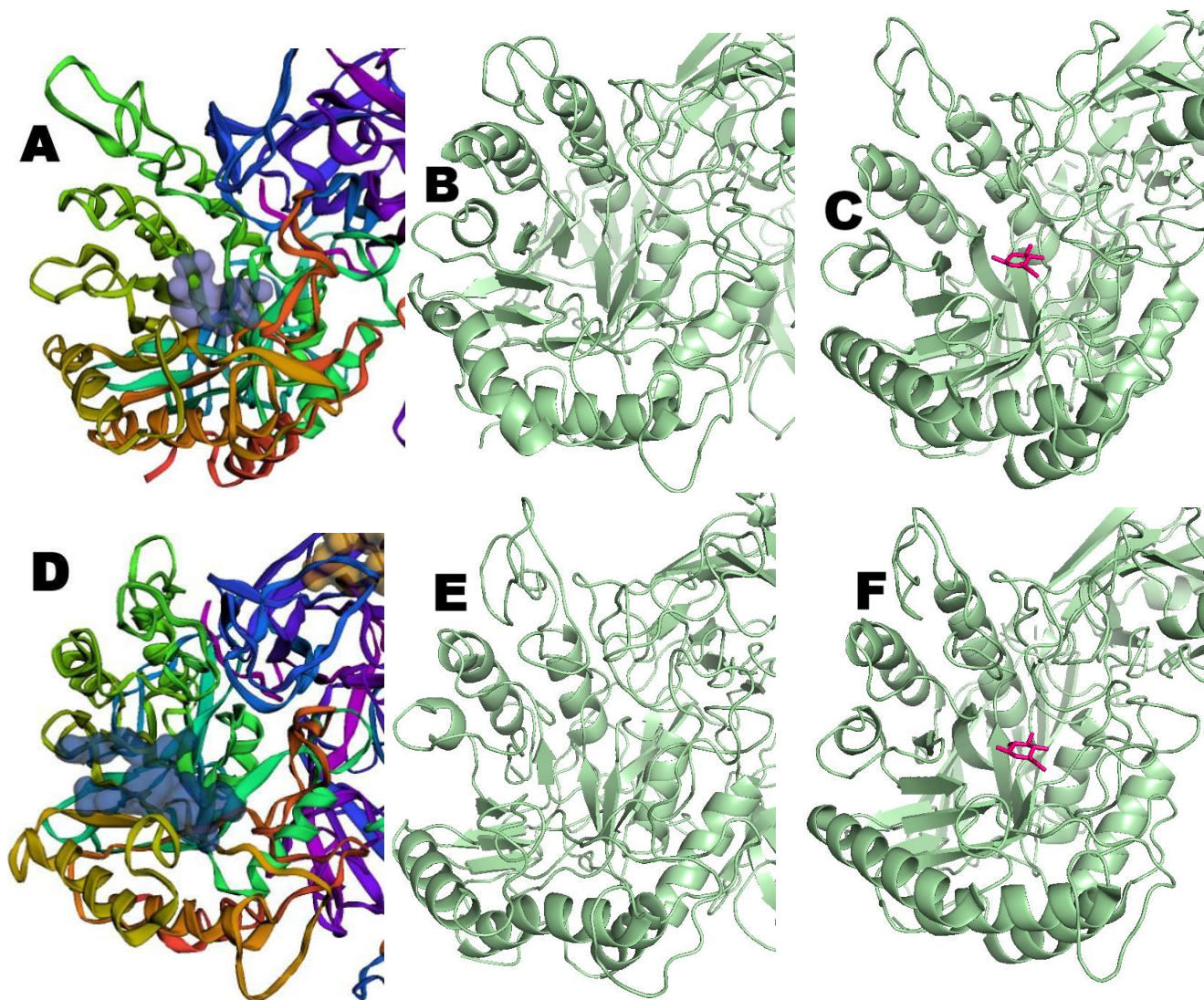


Figura 40. Predicción de bolsillo de unión en la β GLU *E. eligens* a diferentes pHs, obtenido por Fpocket. (A) Área del bolsillo calculado (Azul) de la β GLU *E. eligens* a pH 6.5. (B) Conformación del sitio activo del cluster de la β GLU *E. eligens* a pH 6.5. (C) β GLU *E. eligens* en complejo con el ácido glucurónico (PDB: 6BJQ) en la misma orientación (D) Área del bolsillo calculado (azul marino) a pH 3.0. (E) Conformación del sitio activo del cluster de la β GLU de *E. eligens* a pH 3.0. (F) β GLU *E. eligens* en complejo con el ácido glucurónico (PDB: 6BJQ) en la misma orientación

6.6 Potencial electrostático de la zona de homodimerización

6.6.1 β GLU *E. coli* a pHs 7.4 y 3

Después de analizar las variaciones en el tamaño del sitio activo de las β GLU sometidas a pH ácido y pH óptimo, se evaluaron las modificaciones en el potencial electrostático de la región de homodimerización, la cual incluye residuos pertenecientes a los tres dominios que componen la enzima. El cálculo del potencial electrostático consideró los monómeros como entidades independientes dentro del dímero de la β GLU. La complementariedad de cargas en la zona de homodimerización se interpretó en función de la presencia de cargas opuestas en las mismas interacciones, así como del cálculo promedio de cargas positivas y negativas presentes en ambos monómeros.

A continuación, se presentan los valores promedio de las cargas positivas y negativas de ambos monómeros A y B de la β GLU *E. coli* a pH 7.4, los cuales se encuentran detallados en la Tabla 12.

Tabla 12. Distribución de cargas de la zona de homodimerización de la β GLU de *E. coli* a pH 7.4

ENZIMA	MONÓMERO A	Proporción (%)	MONÓMERO B	Proporción (%)
β GLU <i>E. coli</i> a pH 7.4	CARGAS POSITIVAS	47,58	CARGAS POSITIVAS	36,09
	CARGAS NEGATIVAS	52,42	CARGAS NEGATIVAS	63,91

En el análisis de la distribución cualitativa de cargas de la β GLU de *E. coli* a pH 7.4, la cadena A del dímero (Figura 41A) mostró cargas negativas (color rojo) en las regiones de interacción con las cargas positivas (color azul) de la cadena B del dímero (Figura 41B). Esta complementariedad en la distribución de cargas era previsible, destacando la naturaleza complementaria del potencial electrostático en diversas zonas de la región de dimerización, incluyendo ambos monómeros. Las cargas positivas y negativas son en su mayoría valores no extremos (7 -o -7). Así mismo, también se aprecian regiones con carga neutra (0) representadas de color blanco, las cuales incluyen residuos alifáticos.

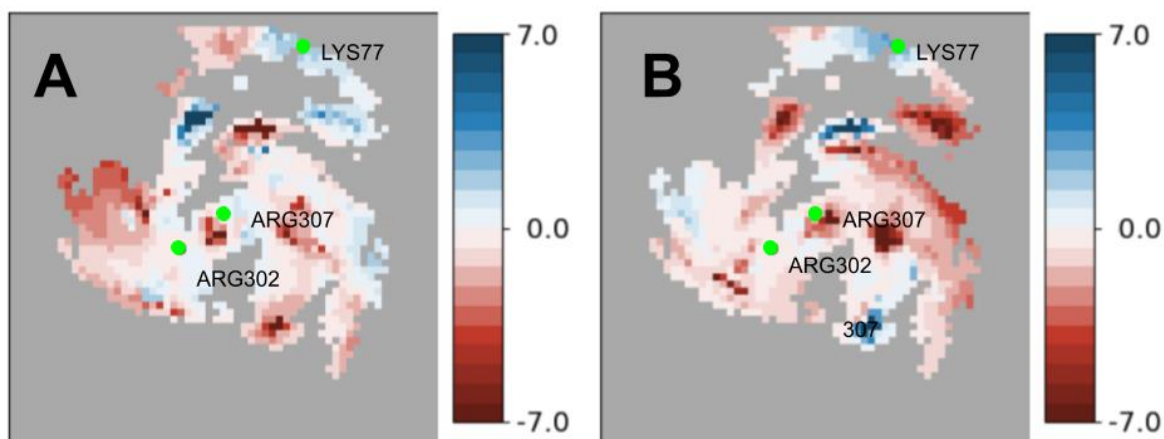


Figura 40. Mapeo del potencial electrostático de la zona de homodimerización de la β GLU *E. coli* (pH 7.4) obtenido en molsurfer (A) Monómero A. (B) Monómero B. Ambas figuras presentan la ubicación de los residuos cargados Lys77, Arg302 y a Arg307. Se muestra la ubicación de los residuos involucrados en interacciones proteína-proteína, representados por un punto verde, vistos desde el lado de los monómeros A y B.

Al simularse a pH 3, se presentan los siguientes valores promedio de las cargas positivas y negativas de ambos monómeros de la β GLU *E. coli*, los cuales se encuentran detallados en la Tabla 13.

Tabla 13. Distribución de cargas de la zona de homodimerización de la β GLU de *E. coli* a pH 3

MONÓMERO A	Proporción (%)	MONÓMERO B	Proporción (%)
CARGAS POSITIVAS	95,23	CARGAS POSITIVAS	97,40
CARGAS NEGATIVAS	4,77	CARGAS NEGATIVAS	2,60

En el análisis de la distribución cualitativa de cargas de la β GLU de *E. coli* a pH 3 el potencial electrostático cambia sustancialmente su distribución de cargas predominando cargas positivas (en azul) y una marcada escasez de cargas negativas (en rojo). Así, en la cadena A del dímero (Figura 42A), se evidencia abundancia de cargas positivas en regiones interactuantes con la cadena B donde predominan cargas negativas (Figura 42B). La limitada presencia de cargas negativas señala una disminución significativa en la

complementariedad de la distribución de cargas al reducir el pH, lo que sugiere una respuesta a nivel del potencial electrostático de la enzima, en comparación con el entorno de pH 7.4.

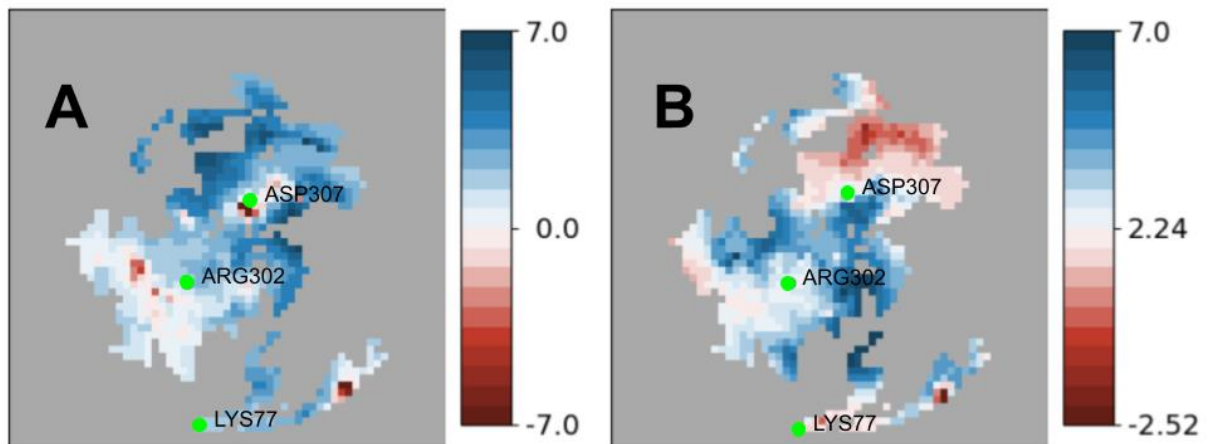


Figura 42. Mapeo del potencial electrostático de la zona de homodimerización de la β GLU *E. coli* (pH 3) obtenido en molsurfer (A) Monómero A . (B) Monómero B. Ambas figuras presentan la ubicación de los residuos cargados Lys77, Arg302 y a Arg307 .Se muestra la ubicación de los residuos involucrados en interacciones proteína-proteína, representados por un punto verde, vistos desde el lado de los monómeros A y B.

La comparación del potencial electrostático en la zona de homodimerización de la β GLU *E. coli* a pH 7.4 y pH 3 revela notables diferencias en el espectro de cargas. A pH 7.4, ambas cadenas de la β GLU *E. coli* exhiben un espectro de cargas simétrico, oscilando entre +7 y -7. Este rango de cargas en la zona de homodimerización se representa mediante una barra de colores azul y rojo en el lado derecho del mapa de potencial eléctrico, como se muestra en la Figura 41. En contraste, a pH 3, el espectro de cargas no es equitativo, lo que implica una falta de complementariedad. El espectro de cargas a pH 3 se localiza en el lado derecho del mapa de potencial eléctrico de la Figura 42, y aquí se observa que, mientras que la cadena A abarca desde +7 hasta -7, la cadena B se restringe a un rango que va desde +7 hasta -3.21.

De este modo, hemos observado que a pH 7.4, la β GLU de *E. coli* presenta una mayor distribución de cargas negativas, en comparación con el pH 3, donde se observa una mayor distribución de cargas positivas en la zona de homodimerización.

6.6.2 β GLU *E. eligens* pH 6.5 y 3

De la misma manera, para la β GLU de *E. eligens*, el cálculo del potencial electrostático consideró los monómeros como entidades independientes dentro del dímero. La complementariedad de cargas en la zona de homodimerización se interpretó en función de la presencia de cargas opuestas en las interacciones, así como del cálculo promedio de cargas positivas y negativas presentes en ambos monómeros.

A continuación, se presentan los valores promedio de las cargas positivas y negativas de ambos monómeros de la β GLU *E. eligens* a pH 6.5, los cuales se encuentran detallados en la Tabla 14.

Tabla 14. Distribución de cargas de la zona de homodimerización β GLU de *E. eligens* a pH 6.5

MONÓMERO A	Proporción (%)	MONÓMERO B	Proporción (%)
CARGAS POSITIVAS	69,05	CARGAS POSITIVAS	73,89
CARGAS NEGATIVAS	30,95	CARGAS NEGATIVAS	26,11

Como se puede apreciar en la Tabla 14, el monómero A β GLU *E. eligens* a pH 6.5 exhibe un mayor porcentaje de cargas positivas en su potencial electrostático. De manera similar, en el caso del monómero B, también sugiere una mayor complementariedad. Esta similitud en la distribución de cargas indica la presencia complementaria de cargas positivas y negativas, lo cual es crucial para la estabilidad y funcionalidad de la enzima.

En el análisis de la distribución cualitativa de cargas de la β GLU de *E. eligens* a pH 6.5, la Figura 43 ilustra claramente la presencia de cargas positivas (en azul) y negativas (en rojo). En la cadena A del dímero (Figura 43A), se observan cargas negativas en ubicaciones correspondientes a las cargas positivas en la cadena B del dímero (Figura 43B), y viceversa. Esta complementariedad en la distribución de cargas era previsible, destacando la naturaleza complementaria del potencial electrostático en diversas zonas de la región de dimerización, incluyendo tanto la cadena A como la cadena B.

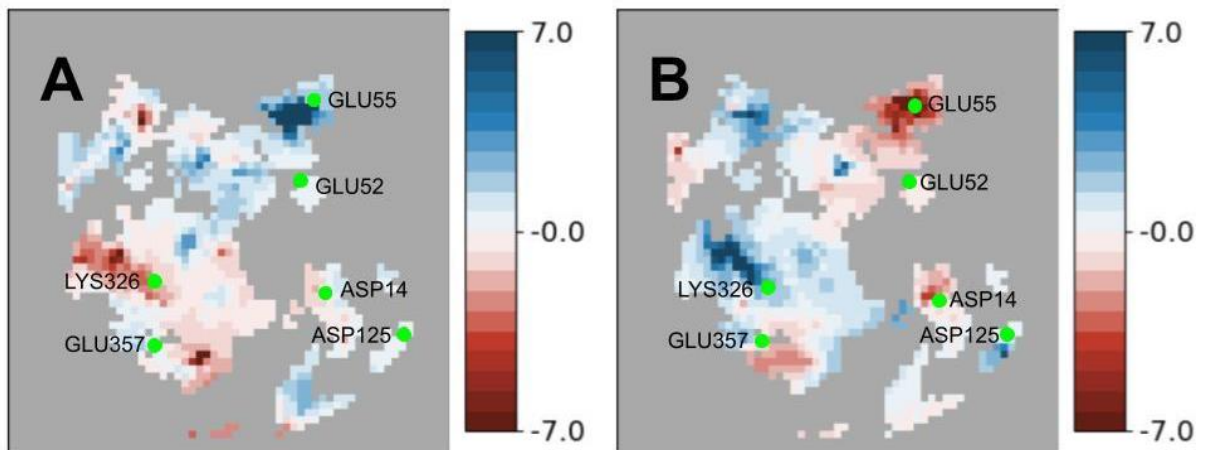


Figura 43. Mapeo del Potencial Electrostático de la Zona de Homodimerización (A) Potencial electrostático del interfaz cadena A de la β GLU *E. eligens* (pH 6.5) (B) Potencial electrostático del interfaz cadena B de la β GLU *E. eligens* (pH 6.5). Se muestra la ubicación de los residuos involucrados en interacciones proteína-proteína, representados por un punto verde, vistos desde el lado de los monómeros A y B.

Al simularse a pH 3, se presentan los siguientes valores promedio de las cargas positivas y negativas de ambos monómeros de la β GLU *E. eligens*, los cuales se encuentran detallados en la Tabla 15.

Tabla 15 .Distribución de cargas de la zona de homodimerización de β GLU de *E. eligens* a pH 3

MONÓMERO A	Proporción (%)	MONÓMERO B	Proporción (%)
CARGAS POSITIVAS	96,78	CARGAS POSITIVAS	97,41
CARGAS NEGATIVAS	3,22	CARGAS NEGATIVAS	2,59

Como se aprecia en la Tabla 15, el monómero A exhibe un mayor porcentaje de cargas positivas en su potencial electrostático. De manera similar, en el caso del monómero B, la complementariedad se reduce. Está marcada discrepancia en los promedios de cargas positivas y negativas señala una reducción en la presencia complementaria de estas cargas.

En el análisis de la distribución cualitativa de cargas de la β GLU de *E. eligens* a pH 3, la Figura 44 destaca claramente la presencia de cargas positivas (representadas en azul) y una marcada escasez de cargas negativas (en rojo). En la cadena A del dímero (Figura 44A), se evidencia una prevalencia de cargas positivas en regiones coincidentes con las

zonas positivas del lado de la cadena B (Figura 44B). La limitada presencia de cargas negativas señala una disminución significativa en la complementariedad de la distribución de cargas al reducir el pH, lo que sugiere una respuesta electrostática alterada en comparación con el entorno de pH 6.5.

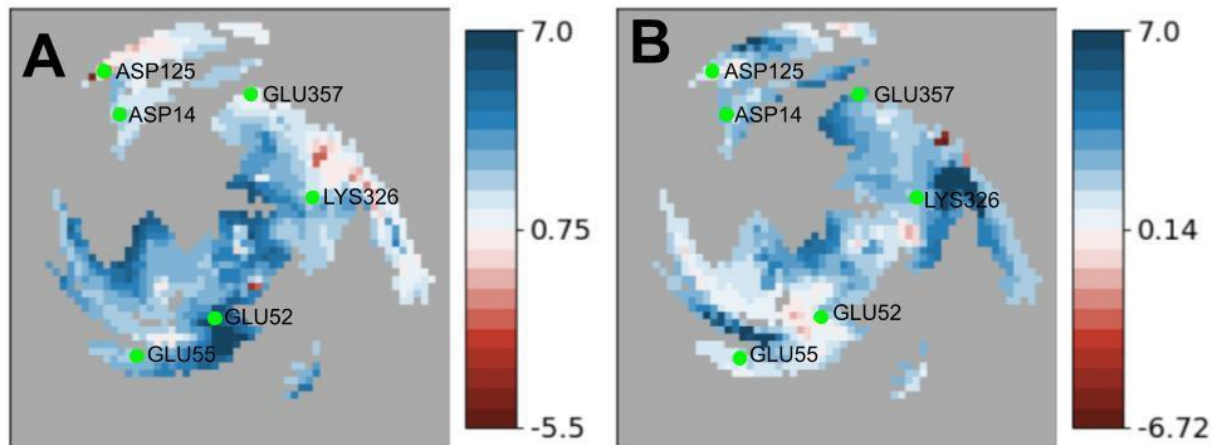


Figura 44. Mapeo del Potencial Electrostático de la Zona de Homodimerización (A) Potencial electrostático del interfaz cadena A de la β GLU *E. eligens* (pH 3) con zonas de carga que se complementan con la cadena B. (B) Potencial electrostático del interfaz cadena B de la β GLU *E. eligens* (pH 3) con zonas de carga que se complementan con la cadena A. Se muestra la ubicación de los residuos involucrados en interacciones proteína-proteína, representados por un punto verde, vistos desde el lado de los monómeros A y B.

La complementariedad de las cargas en la β GLU *E. eligens* experimentó un cambio significativo a pH 3, como se evidencia en la comparación de la distribución de cargas en el mapeo del potencial electrostático de la zona de homodimerización. En las Figuras 43 y 44, las cargas son representadas mediante un espectro de colores que va desde el azul hasta el rojo, correspondiendo a cada cadena. La complementariedad de cargas en la zona de homodimerización se identifica por la presencia de cargas opuestas en las mismas regiones .

De este modo, hemos observado que a pH 6.5, la β GLU de *E. eligens* presenta una mayor distribución de cargas negativas, en comparación con el pH 3, donde se observa una mayor distribución de cargas positivas en la zona de homodimerización.

6.7 Energía potencial

Para estimar si el cambio de pH afectaba la estabilidad de las enzimas de estudio, se compararon los valores de energía potencial obtenidos a pH óptimo vs. pH ácido. Se

observó que las β GLU *E. coli* y *E. eligens* presentaron valores de energía potencial más negativos (mayor estabilidad) cuando se simularon a pH óptimo que a pH ácido. Así, la β GLU de *E. coli* mostró una energía potencial de -85.236 KJ/mol (-20.371 Kcal/mol) a pH óptimo a los 35.9 ns (Figura 45) , momento en el cual se extrajo la estructura representativa de la simulación al pH indicado (cluster). En contraste, a pH ácido se registró un valor de -28.344 KJ/mol (6.774 Kcal/mol) a los 36.25 ns (Figura 45). Esta observación claramente señala una reducción significativa en la energía potencial de la β GLU de *E. coli* en un entorno ácido.

Energía potencial

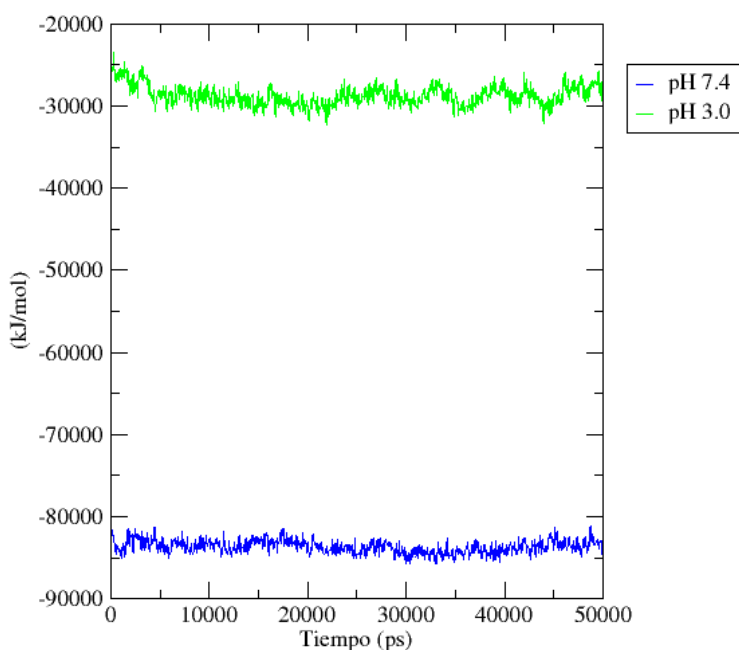


Figura 45. Fluctuación de la energía potencial de la β GLU *E. coli* durante la trayectoria a pH óptimo 7.4 y pH ácido 3. Energía obtenida de la proteína.

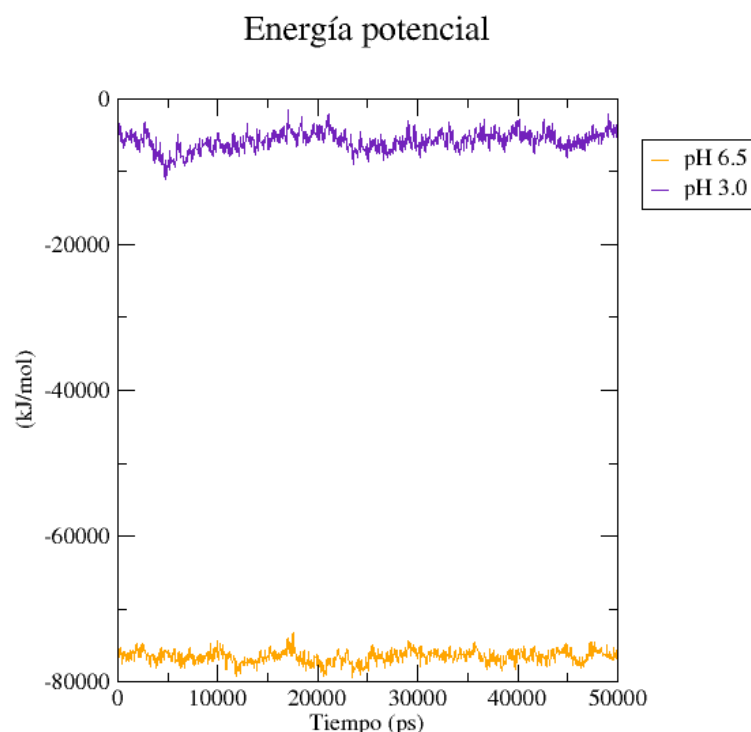


Figura 46. Energía potencial de la β GLU *E. eligens* durante la trayectoria pH óptimo 6.5 y pH ácido 3. Energía obtenida de la proteína.

En el caso de la β GLU de *E. eligens*, su energía potencial a pH óptimo (Figura 46) fue de -77.087 KJ/mol (-18.424 Kcal/mol) a los 39.45 ns, mientras que a pH ácido (Figura 46) se observó un valor de -4.901 KJ/mol (-1.171 Kcal/mol) a los 40.5 ns. Una vez más, se evidencia una marcada disminución en la energía potencial de la β GLU de *E. eligens* en condiciones ácidas.

VII. DISCUSIÓN

Este estudio tuvo como objetivo predecir, mediante simulaciones de dinámica molecular, los cambios estructurales y la pérdida de estabilidad en las β -glucuronidasas (β GLU) de *Escherichia coli* y *Eubacterium eligens* inducidos por un descenso del pH. Para ello, se empleó un enfoque *in silico* que combinó visualización molecular, modelado computacional, dinámica molecular y análisis electrostáticos, con el fin de evaluar el impacto de condiciones ácidas sobre la conformación y función de estas enzimas.

Los resultados mostraron que las enzimas β GLU de *E. coli* y *E. eligens* experimentaron alteraciones significativas en su estructura y estabilidad al simularse en un entorno de pH ácido. Estas modificaciones estructurales se asociaron con variaciones en las cargas eléctricas de residuos clave, lo que indica que el ambiente ácido podría influir en la

conformación y, posiblemente, en la función de ambas enzimas. Dichos hallazgos respaldan la hipótesis de que un pH reducido, como el generado por la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) mediante probióticos, podría desempeñar un papel crucial en la regulación de la actividad enzimática *in vitro*.

Para asegurar que los cambios observados reflejan verdaderos efectos del pH, incluimos un control positivo que demostró que las áreas de cargas positivas y negativas de la enzima simulada a pH 5.1 (7AAT) y la enzima resuelta experimentalmente a pH 5.1 (8AAT) coincidían tanto en la región anterior como posterior, además de presentar un RMSD menor a 1 Å, lo que indica una alta similitud estructural entre ellas. Sin embargo, pese a que ambas enzimas seguían los mismos patrones de distribución de cargas, observamos variaciones en la intensidad del color en los mapas electrostáticos, un fenómeno que podría considerarse normal dado que la asignación de estados de protonación depende de cálculos de pKa teóricos. Estos cálculos pueden diferir entre herramientas computacionales y condiciones experimentales, lo que introduce un margen de variabilidad. Una posible explicación para estas discrepancias radica en el campo de fuerza utilizado, en este caso AMBER, empleado tanto para nuestra dinámica molecular como para el control positivo, el cual se basa en modelos de cargas puntuales fijas que simplifican la distribución real de cargas y podrían no capturar completamente los efectos sutiles de polarización o del entorno electrostático local [29]. Además, no debemos pasar por alto las diferencias en la resolución cristalográfica de las estructuras involucradas: nuestra enzima de referencia (7AAT) fue resuelta a 1.9 Å, mientras que la estructura experimental a pH 5.1 (8AAT) tiene una resolución de 2.3 Å. Esta diferencia, aunque aparentemente pequeña, puede influir en la precisión de la ubicación de los átomos y, por ende, en la interpretación de las cargas asignadas durante la simulación. En conjunto, estos factores como las limitaciones inherentes al campo de fuerza, las aproximaciones en los cálculos de protonación y las diferencias en la resolución estructural, explican las variaciones en la intensidad de las cargas observadas en las zonas que, pese a todo, mantuvieron su perfil electrostático global.

Estas consideraciones sobre el control positivo validan la confiabilidad de nuestro sistema de simulación, permitiéndonos atribuir las diferencias observadas en los siguientes análisis. Con esta base, el análisis estructural realizado mediante la DM permitió identificar ajustes relevantes en la conformación de las β GLU de *E. coli* y *E. eligens* bajo

condiciones de acidez. Entre estos cambios destacan fluctuaciones en los residuos, alteraciones en las propiedades electrostáticas, reconfiguraciones en los enlaces de hidrógeno, variaciones en el tamaño de los bolsillos de unión y redistribuciones en la densidad de cargas en las regiones de homodimerización. Estos resultados no solo confirman la sensibilidad de ambas enzimas a un pH ácido, sino que también proporcionan información detallada sobre los mecanismos moleculares que podrían estar detrás de dicha respuesta.

Para analizar el comportamiento dinámico de las β GLUs, se simuló por DM un entorno a 300 K y se emplearon descriptores moleculares como RMSD, RMSF y SASA. En particular, el RMSD mostró que ambas enzimas presentaron un aumento en la desviación estándar a pH ácido, lo que sugiere que la enzima sufrió más rearrreglos estructurales, lo cual podría conllevar a reducir su estabilidad a pH 3. El impacto del pH en la conformación 3D de las enzimas ha sido ampliamente estudiado, por ejemplo en el factor de crecimiento de queratinocitos (rhKGF) y la pirazinamidasa tipo salvaje (PZasa), que también demostraron rearrreglos y desestabilización energética en condiciones de pH ácidas [30,31]. Por otra parte, la quitinasa II aislada de *Thermomyces lanuginosus* mostró variaciones de RMSD similares, indicando reestructuraciones sin concluir que la enzima fuera inestable a pH ácido [32]. Por lo tanto, para evaluar de manera integral la estabilidad de la β GLU en un entorno ácido, resulta esencial complementar el análisis del RMSD con otros parámetros estructurales clave, como el RMSF, Rg, SASA y enlaces de hidrogeno.

Los rearrreglos observados en ambas β GLUs a pH ácido se deben a un aumento de cargas positivas y su repulsión, lo que conduce a mayor cambios conformacionales en la enzima; este fenómeno puede generar una pérdida de estructura secundaria y afecta las interacciones intermoleculares, lo que puede resultar en una agregación irreversible [30,33]. Además, el RMSF, que complementa la información sobre fluctuaciones, también mostró que ambas β GLUs presentan una mayor fluctuación y flexibilidad en un entorno ácido vs. pH óptimo. Este fenómeno fue igualmente observado en rhKGF y PZasa, donde los valores de RMSF aumentaron en condiciones ácidas [30,31]; así, el aumento del RMSD en ambas β GLUs indica que las desviaciones desde la estructura inicial no necesariamente reflejan la movilidad de los elementos estructurales. Sin embargo, el análisis conjunto con el RMSF sugiere que las β GLUs de *E. coli* y *E. eligens*

presentan mayor flexibilidad a pH ácido, especialmente en residuos ácidos como el aspartato y el ácido glutámico de la enzima [34].

Por su parte, el aumento en el radio de giro (Rg) de ambas β GLUs a pH ácido indica una menor compactación y estabilidad; este comportamiento se alinea con lo observado en rhKGF y PZasa, donde el aumento del Rg a pH ácido contrasta con los valores más bajos y la mayor estabilidad en condiciones neutras y alcalinas [34,35]. Asimismo, el aumento en el Rg sugiere que las regiones con mayor grado de fluctuación están relacionadas con la repulsión electrostática, ya que en un entorno ácido, varios residuos se protonan o ionizan [31]. Este fenómeno se complementa con el análisis de la superficie accesible al solvente (SASA), que mostró un aumento en el SASA de β GLUs a pH ácido, indicando así una mayor relajación estructural y, por ende, menor estabilidad; esta tendencia también fue documentada en los resultados *in silico* del rhKGF y PZasa [30,31].

La combinación de estos resultados —mayor flexibilidad, menor compactación, mayor área superficial accesible al solvente y reducción en el número de enlaces de hidrógeno— apunta hacia un cambio conformacional significativo en ambas β GLUs a pH ácido. Este cambio también fue evidente en los análisis de clústeres conformacionales, donde se observaron desplazamientos estructurales notables. Al comparar las conformaciones representativas obtenidas a partir de los análisis de dinámica molecular, se evidenció que las estructuras representativas de las β GLUs, estructura clúster; a pH ácido tienden a posicionarse visualmente por encima de los correspondientes a pH óptimo, tanto en *E. coli* como en *E. eligens*. Esta reorganización espacial está en línea con los valores de RMSD, radio de giro (Rg) y área superficial accesible al solvente (SASA), los cuales aumentaron considerablemente bajo condiciones ácidas, indicando una mayor flexibilidad global y una expansión estructural general de las enzimas.

A pH ácido, las β -glucuronidasas (β GLU) de *E. coli* y *E. eligens* experimentaron alteraciones en sus propiedades electrostáticas, particularmente en el sitio activo y la interfaz de homodimerización. La disposición espacial sugiere un mecanismo de perturbación electrostática en cascada, tal que los residuos con alteraciones marcadas (>0.005) modificarían el microentorno de residuos adyacentes clave, incluso cuando estos últimos mantienen su carga relativamente estable. Por ejemplo, en *E. coli*, la pérdida de

complementariedad de cargas entre Asp300 (cambio significativo) y Arg302 (cambio mínimo) en la interfaz de homodimerización podría explicar la disminución en la estabilidad del complejo enzimático observada a pH ácido. De manera similar, en *E. eligens*, la proximidad de Glu413 (cambio alto) a Glu297 (cambio alto) en el sitio activo podría alterar la afinidad por el sustrato [36,37]. Estos hallazgos coinciden con lo reportado para otras enzimas como las α -amilasas, donde cambios en residuos periféricos afectan la actividad catalítica sin modificar directamente el sitio activo [38]. La evidencia sugiere que, en ambos sistemas, las redes electrostáticas extendidas actúan como "sensores" de pH, transmitiendo perturbaciones locales a regiones funcionales distantes. Además, los residuos catalíticos críticos, como Glu450 y Glu451 en *E. coli* (y sus equivalentes Glu425 y Glu516 en *E. eligens*), también experimentaron cambios en sus propiedades electrostáticas debido al entorno ácido. Estos residuos son esenciales para la actividad catalítica, así Glu450 actúa como ácido catalítico, cediendo un protón al oxígeno glucosídico del residuo terminal de ácido glucurónico, mientras que Glu451 funciona como base catalítica, generando un nucleófilo hidroxilo (OH^-) que ataca el carbono anomérico. Ambos residuos forman una red de cargas electrostáticas que estabiliza el intermedio oxonio durante la hidrólisis. Por lo tanto, la alteración de estas cargas en un entorno ácido afecta directamente la unión y procesamiento del sustrato, como ha sido resaltado en estudios previos, como el de Xia Lv et al., donde se analiza la estructura y función de las β -glucuronidasas para la identificación de inhibidores [39]. No solo los cambios en las cargas de los residuos activos influyen en la unión al sustrato, sino también el aumento del tamaño del bolsillo de unión observado a pH ácido. Este fenómeno, similar a lo reportado en otras enzimas como PZasa [31], sugiere que las interacciones necesarias para mantener el sustrato en su lugar se ven comprometidas, lo que podría reducir la eficiencia catalítica. Además, los análisis de RMSF detectaron un aumento en la flexibilidad de ciertos residuos que forman parte del dominio TIM barrel. En la β GLU de *E. coli*, este efecto se observó específicamente en los residuos descritos en la tabla 8, mientras que en la β GLU de *E. eligens* afectó a los residuos descritos en la tabla 11. Estas variaciones en la flexibilidad y longitud de los bucles podrían modular la afinidad y especificidad por el sustrato, como se ha reportado en estudios previos sobre dominios PDZ (PSD-95/Discs-large/ZO-1) asociados a trastornos del sistema nervioso central. En tales casos, la dinámica conformacional de los bucles adyacentes al sitio de unión determina directamente su interacción con ligandos [40]

De forma global, los cambios observados a pH ácido como la alteración de las cargas electrostáticas de los residuos activos, el aumento del tamaño del bolsillo de unión y la modificación en la flexibilidad y tamaño de los bucle, tendrían un impacto directo en la afinidad de ambas β GLUs por su sustrato. Estos hallazgos resaltan la importancia del pH como un factor crítico que modula la funcionalidad enzimática, reduciendo la eficiencia catalítica de ambas β GLU en condiciones ácidas, como las que ocurrieron en el estudio de metabolitos de fermentación como los SCFAs que inhibieron la actividad de la β GLU al disminuir el pH [17].

Desde el punto de vista energético, se observó que ambas β GLU (*E. coli* y *E. eligens*) presentaron un aumento significativo en su energía potencial cuando se encontraban a pH ácido, en comparación con su pH óptimo. Este hallazgo es relevante, ya que la energía potencial es un parámetro clave en la dinámica molecular para evaluar la estabilidad de las proteínas. Un aumento en la energía potencial sugiere que la enzima se encuentra en un estado menos estable, lo que coincide con los cambios conformacionales y la pérdida de compactación observados previamente.

La importancia de la energía potencial en la estabilidad de las proteínas ha sido documentada. Por ejemplo, en estudios sobre el efecto de osmolitos (moléculas pequeñas que modulan la estabilidad proteica), se ha demostrado que estas moléculas estabilizan las proteínas al reducir su energía potencial global, favoreciendo así la conformación nativa y aumentando la estabilidad termodinámica [41]. En contraste, el aumento de la energía potencial observado en las β GLU a pH ácido indica una mayor inestabilidad, lo que se correlaciona con los mayores rearrreglos estructurales, la disminución de la afinidad al sustrato y la pérdida de función enzimática.

Estos resultados están en línea con nuestra hipótesis, la cual propone que la inhibición de la β GLU de *E. coli*, mediada por los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) producidos por probióticos, ocurre debido a un cambio en la estabilidad y estructura del dímero de la enzima, inducido por un pH bajo. De manera similar, en el caso de la β GLU de *E. eligens*, que es la principal enzima responsable de la reactivación de SN38-G en el intestino,

hipotetizamos que un pH ácido también inhibe su función al afectar su estabilidad y estructura, tal como ocurre en *E. coli*.

El aumento de la energía potencial a pH ácido, junto con los cambios conformacionales y la pérdida de afinidad al sustrato, respalda nuestra hipótesis al demostrar que el pH ácido induce un estado inestable en ambas enzimas, lo que compromete su función catalítica. Estos hallazgos sugieren que el pH ácido, ya sea directamente o a través de la acción de SCFAs, actúa como un factor crítico que modula la actividad de las β GLU, afectando tanto su estructura como su capacidad para procesar sustratos.

Estos hallazgos no solo respaldan nuestra hipótesis inicial, sino que también abren nuevas vías para futuras investigaciones. Por ejemplo, futuros estudios podrían explorar el diseño de inhibidores específicos que aprovechen los cambios conformacionales inducidos por el pH ácido, lo que podría ser útil en aplicaciones terapéuticas, como la reducción de la toxicidad intestinal asociada a la reactivación de SN38-G por *E. eligens*. Además, el uso de probióticos para modular el pH intestinal y, por ende, la actividad de las β GLU, podría ser una estrategia prometedora en el manejo de enfermedades relacionadas con la microbiota intestinal.

VIII. CONCLUSIONES

El pH ácido induce (1) cambios conformacionales y (2) electrostáticos significativos en las β -glucuronidasas (β GLU) de *E. coli* y *E. eligens*, afectando su estabilidad, estructura y función catalítica. Se observó que el pH ácido aumenta la flexibilidad de los residuos, reduce la compactación de la enzima, altera el tamaño del bolsillo de unión y disminuye el número de enlaces de hidrógeno, lo que sugiere una pérdida de estabilidad estructural. Además, los cambios en las cargas electrostáticas de residuos clave, como Glu450 y Glu451 en *E. coli* (y sus equivalentes en *E. eligens*), afectan directamente la unión y procesamiento del sustrato, reduciendo la afinidad y eficiencia catalítica de ambas enzimas. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la inhibición de la β GLU de *E. coli*, mediada por los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) producidos por probióticos, ocurre debido a un cambio en la estabilidad y estructura del dímero inducido por un pH bajo. De manera similar, se podría predecir que el pH ácido también inhibe la función de la β GLU de *E. eligens*, afectando su estabilidad y estructura. Estos resultados no solo proporcionan una comprensión detallada de los mecanismos moleculares mediante los cuales el pH ácido regula la actividad de las β GLU, sino que también abren nuevas vías para futuras investigaciones, como el diseño de inhibidores específicos y el uso de probióticos para modular la actividad enzimática en aplicaciones terapéuticas. En conjunto, este estudio sienta las bases para explorar estrategias que permitan manipular la actividad de estas enzimas en el contexto de enfermedades relacionadas con la microbiota intestinal y la toxicidad asociada a la reactivación de metabolitos.

IX. REFERENCIAS

- [1]Álvarez Calatayud, Guillermo, Guarner, Francisco, Requena, Teresa, & Marcos, Ascensión. (2018). Dieta y microbiota. Impacto en la salud. *Nutrición Hospitalaria*, 35(spe6), 11-15. Epub 06 de julio de 2020.<https://dx.doi.org/10.20960/nh.2280>
- [2]Requena, T., & Velasco, M. (2018). Microbioma humano en la salud y la enfermedad. En *Revista Clínica Española* (pp. 1-8). Madrid. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2019.07.004>
- [3]Julia Álvarez, José Manuel Fernández Real, Francisco Guarner, Miguel Gueimonde, Juan Miguel Rodríguez, Miguel Saenz de Pipaon, Yolanda Sanz, Microbiota intestinal y salud, *Gastroenterología y Hepatología*, Volume 44, Issue 7, 2021, Pages 519-535, ISSN 0210-5705, <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009>.
- [4]CHENG, Wing Yin; WU, Chun-Ying; YU, Jun. The role of gut microbiota in cancer treatment: friend or foe?. *Gut*, 2020, vol. 69, no 10, p. 1867-1876.<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321153>
- [5]Nakatsuji, T., Chen, T. H., Butcher, A. M., Trzoss, L. L., Nam, S. J., Shirakawa, K. T., ... & Gallo, R. L. (2018). A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia. *Science Advances*, 4(2), eaao4502. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao4502>
- [6]Cancer Tomorrow. (2023). Retrieved 03 January 2024, from <https://acortar.link/g7IWW0>
- [7]Bermúdez Garcell, Alejandro Jesús, Serrano Gámez, Nilvia Bienvenida, Teruel Ginés, Rolando, Leyva Montero, María de los Ángeles, & Naranjo Coronel, Anthony Alfonso. (2019). Biología del cáncer. *Correo Científico Médico*, 23(4), 1394-1416. Epub 01 de diciembre de 2019. Recuperado en 11 de abril de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812019000401394&lng=es&tlng=es.
- [8]Huang, CY, Ju, DT, Chang, CF, Reddy, PM y Velmurugan, BK (2017). A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in the treatment of non-small cell lung cancer. *Biomedicina*, 7 (4).<https://doi.org/10.1051/bmdcn/2017070423>
- [9]Entezar-Almahdi, E., Mohammadi-Samani, S., Tayebi, L., & Farjadian, F. (2020). Recent Advances in Designing 5-Fluorouracil Delivery Systems: A Stepping Stone in the Safe Treatment of Colorectal Cancer. *International journal of nanomedicine*, 15, 5445–5458. <https://doi.org/10.2147/IJN.S257700>
- [10]Christian Bailly, Irinotecan: 25 years of cancer treatment, *Pharmacological Research*, Volume 148, 2019, 104398, ISSN 1043-6618, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104398>.
- [11]Tukey, R. H., Strassburg, C. P., & Mackenzie, P. I. (2002). Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferases and irinotecan toxicity. *Molecular pharmacology*, 62(3), 446-450. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.62.3.446>

- [12]Paul Awolade, Nosipho Cele, Nagaraju Kerru, Lalitha Gummidi, Ebenezer Oluwakemi, Parvesh Singh, Therapeutic significance of β -glucuronidase activity and its inhibitors: A review, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 187, 2020, 111921, ISSN 0223-5234, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111921>.
- [13]Pollet, R. M., D'Agostino, E. H., Walton, W. G., Xu, Y., Little, M. S., Biernat, K. A., ... & Redinbo, M. R. (2017). An atlas of β -glucuronidases in the human intestinal microbiome. *Structure*, 25(7), 967-977. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.05.003>
- [14]Jariwala, P. B., Pellock, S. J., Goldfarb, D., Cloer, E. W., Artola, M., Simpson, J. B., ... & Redinbo, M. R. (2019). Discovering the microbial enzymes driving drug toxicity with activity-based protein profiling. *ACS chemical biology*, 15(1), 217-225. doi:10.1021/acscchembio.9b00788.
- [15]Wang, X., Zhang, P., & Zhang, X. (2021). Probiotics Regulate Gut Microbiota: An Effective Method to Improve Immunity. *Molecules*, 26(19), 6076. <https://doi.org/10.3390/molecules26196076>
- [16]Nowak A, Paliwoda A, Błasiak J. Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(21):3456-3467. doi: 10.1080/10408398.2018.1494539. Epub 2018 Oct 16. PMID: 30010390.
- [17]Arenahalli Ningegowda, M., & Siddalingaiya Gurudutt, P. (2012). In vitro fermentation of prebiotics by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194: selectivity, viability and effect of metabolites on β -glucuronidase activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 901-908. DOI 10.1007/s11274-011-0887-z
- [18]Danish Idrees, Mohd. Shahbaaz, Krishna Bisetty, Asimul Islam, Faizan Ahmad & Md. Imtaiyaz Hassan (2017) Effect of pH on structure, function, and stability of mitochondrial carbonic anhydrase VA, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35:2, 449-461, DOI: 10.1080/07391102.2016.1149097
- [19]Flannelly, D. F., Aoki, T. G., & Aristilde, L. (2015). Short-time dynamics of pH-dependent conformation and substrate binding in the active site of beta-glucosidases: A computational study. *Journal of Structural Biology*, 191(3), 352-364. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.07.002>
- [20]Suplatov, D., Panin, N., Kirilin, E., Shcherbakova, T., Kudryavtsev, P., & Švedas, V. (2014). Computational design of a pH stable enzyme: understanding molecular mechanism of penicillin acylase's adaptation to alkaline conditions. *PloS one*, 9(6), e100643.
- [21]Boonamnaj, P., Pandey, R. B., & Sompornpisut, P. (2022). Effect of pH on the stability of the dimer structure of the main protease of coronavirus-2. *Biophysical Chemistry*, 287, 106829. ISSN 0301-4622. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2022.106829>.

- [22]Cabrera-Jaime, S., Martínez, C., Ferro-García, T., Giner-Boya, P., Icart-Isern, T., Estrada-Masllorens, J. M., & Fernández-Ortega, P. (2018). Efficacy of *Plantago major*, chlorhexidine 0.12% and sodium bicarbonate 5% solution in the treatment of oral mucositis in cancer patients with solid tumour: a feasibility randomised triple-blind phase III clinical trial. *European Journal of Oncology Nursing*, 32, 40-47.<https://doi.org/10.1016/j.ejon.2017.11.006>
- [23]de Lemos, M. L., Guenter, J., & Kletas, V. (2018). Loperamide and cardiac events: Is high-dose use still safe for chemotherapy-induced diarrhea?. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 24(8), 634-636. <https://doi.org/10.1177/1078155217718384>
- [24]Diaz, R., Kober, K.M., Viele, C. et al. Distinct diarrhea profiles during outpatient chemotherapy. *Support Care Cancer* 29, 2363–2373 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00520-020-05753-x>
- [25]Vera-Peña MY, Rodriguez WL. Effect of pH on the growth of three lactic acid bacteria strains isolated from sour cream, *Universitas Scientiarum*, 25 (2): 341-358, 2020. doi: 10.11144/Javeriana.SC25-2.eopo
- [26]Bret D. Wallace et al. ,Alleviating Cancer Drug Toxicity by Inhibiting a Bacterial Enzyme.*Science*, 330,831-835(2010).DOI:10.1126/science.1191175
2015
- [27]Wallace BD, et al. Structure and Inhibition of Microbiome β -Glucuronidases Essential to the Alleviation of Cancer Drug Toxicity. *Chem Biol*. 2015 Sep 17;22(9):1238-49. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.08.005.
- [28]Pellock, S. J., Creekmore, B. C., Walton, W. G., Mehta, N., Biernat, K. A., Cesmat, A. P., ... & Redinbo, M. R. (2018). Gut microbial β -glucuronidase inhibition via catalytic cycle interception. *ACS central science*, 4(7), 868-879.DOI: 10.1021/acscentsci.8b00239
- [29] Wang J, Tingjun H. Application of Molecular Dynamics Simulations in Molecular Property Prediction I: Density and Heat of Vaporization. *J Chem Theory Comput*. 2011 Jul 12;7(7):2151-2165. doi: c. PMID: 21857814; PMCID: PMC3156483.
- [30]Boroujeni, M. B., Dastjerdeh, M. S., Shokrgozar, M., Rahimi, H., & Omidinia, E. (2021). Computational driven molecular dynamics simulation of keratinocyte growth factor behavior at different pH conditions. *Informatics in Medicine Unlocked*, 23, 100514.<https://doi.org/10.1016/j.imu.2021.100514>
- [31]Esmaeeli, R., Mehrnejad, F., Mir-Derikvand, M., & Gopalpoor, N. (2019). Computational insights into pH-dependence of structure and dynamics of pyrazinamidase: A comparison of wild type and mutants. *Journal of cellular biochemistry*, 120(2), 2502-2514.doi:10.1002/jcb.27543
- [32] Faez Iqbal Khan, Krishna Bisetty, Dong-Qing Wei & Md. Imtaiyaz Hassan | Rajni Hatti Kaul (Reviewing Editor) (2016) A pH based molecular dynamics simulations of chitinase II isolated

from *Thermomyces lanuginosus* SSBP, *Cogent Biology*, 2:1, DOI: 10.1080/23312025.2016.1168336

[33]Paco Coralla, S. G. (2022). Determinación por simulación de dinámica molecular del efecto del PH en las interacciones APOE4- β -amiloide y APOE4-heparina y su influencia en las energías de acoplamiento correlacionado con la enfermedad de Alzheimer.

[34]PU, Shang-Zhi; ZHANG, Wen-Hua; SHI, Bi. Effect of pH on structure and stability of collagen-like peptide: Insight from molecular dynamics simulation. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry*, 2011, vol. 10, no 02, p. 245-259.<https://doi.org/10.1142/S0219633611006396>

[35]Barazorda-Ccahuana, H.L.; Nedyalkova, M.; Mas, F.; Madurga, S. Unveiling the Effect of Low pH on the SARS-CoV-2 Main Protease by Molecular Dynamics Simulations. *Polymers* 2021, 13, 3823. <https://doi.org/10.3390/polym13213823>

[36]Hristova, S. H., & Zhivkov, A. M. (2023). Omicron Coronavirus: pH-Dependent Electrostatic Potential and Energy of Association of Spike Protein to ACE2 Receptor. *Viruses*, 15(8), 1752.<https://doi.org/10.3390/v15081752>

[37]McCoy, A. J., Epa, V. C., & Colman, P. M. (1997). Electrostatic complementarity at protein/protein interfaces. *Journal of molecular biology*, 268(2), 570-584.<https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0987>

[38]Yañiquez Vedia, Jorge F., Huanca Lopez, Susana, Tejeda, Leslie K., Aliaga Rossel, Enzo, Peñarrieta Loria, J. Mauricio, & Mollinedo Portugal, Patricia A.. (2019). Determinación de los parametros temperatura, pH y concentración para la nueva enzima α -Amilasa Mg. *Revista Boliviana de Química*, 36(1), 51-59. Recuperado en 13 de agosto de 2025, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602019000100005&lng=es&tlng=es.

[39] Li, J.-X., Wang, Y., Hao, Y., Huo, X.-K., Sun, C.-P., Zhao, X.-X., Wang, J.-C., Zhang, J.-B., Ning, J., Tian, X.-G., Wang, C., Zhao, W.-Y., Lv, X., Li, Y.-C., & Ma, X.-C. (2022). Identification of *Escherichia coli* β -glucuronidase inhibitors from *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e21394>

[40].Tiwari, G., & Mohanty, D. (2013). An in silico analysis of the binding modes and binding affinities of small molecule modulators of PDZ-peptide interactions. *PloS One*, 8(8), e71340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071340>

[41].Ormeño, F., & General, I. J. (2024). Convergence and equilibrium in molecular dynamics simulations. *Communications Chemistry*, 7(1), 26. <https://doi.org/10.1038/s42004-024-01114-5>