



Memoria del XLIX Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

El uso de la fluorometría diferencial de barrido en el estudio y caracterización de proteínas.

The use of differential scanning fluorometry in the study and characterization of proteins.

Cabrera González, Elizabeth Nallely^{1*}; García-Torres, Itzhel²;
Nájera-Benavides, Diego^{2,3} y Torres-Larios, Alfredo¹.

1. Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.
2. Laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud.
3. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

*Correspondencia: Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, C.P. 04510, CDMX, México. Tel: +52(55)56225657, ncabrera@ifc.unam.mx

Resumen

La fluorometría diferencial de barrido (*Differential scanning fluorimetry*, DSF) también conocida como ensayo de desplazamiento térmico (*Thermal Shift Assay*, TSA) es un método que consiste en la determinación de la temperatura media de desnaturalización de una proteína ($T_{m,app}$) y se determina monitoreando el aumento de fluorescencia del *SYPRO orange*, un colorante que tiene afinidad por regiones hidrofóbicas en las proteínas que quedan expuestas a medida que la proteína se va desplegando por el incremento de la temperatura. La T_m aparente se obtiene del punto medio de la transición del ajuste de la curva. Esta técnica tiene numerosas aplicaciones, debido a que se pueden evaluar diferentes variables que ayuden a la estabilización de las proteínas. Por ejemplo, la búsqueda de pHs óptimos, concentración de sales, osmolitos, las mejores condiciones para el almacenamiento de la proteína de estudio y para el mantenimiento de las interacciones proteína-ligando. También, se ha utilizado para analizar el efecto de mutaciones en la estabilidad térmica de las proteínas. En la actualidad, este método es ampliamente usado en ensayos de cristalización y en la búsqueda de moléculas pequeñas con potencial terapéutico. Una de las principales ventajas del TSA es su capacidad para hacer

Abstract

Differential scanning fluorometry (DSF), also known as Thermal Shift Assay (TSA), is a method that consists of determining the average denaturation temperature of a protein ($T_{m,app}$) and is determined by monitoring the increase in fluorescence of *SYPRO orange*, a dye that shows affinity for the hydrophobic regions of proteins that are exposed as the protein unfolds due to the increase in temperature. Apparent T_m is obtained from the midpoint of transition of the fitted curve. This technique has numerous applications, since different variables that help protein stabilization can be evaluated. For example, the search for optimal pHs, the concentration of salts and osmolytes, the best conditions for the storage of the protein of interest and for the maintenance of protein-ligand interactions. It has also been used to analyze the effect of mutations on the thermal stability of proteins. Currently, this method is widely used in crystallization assays and in the search for ligands with therapeutic potential. One of the main advantages of TSA is its ability to perform high-throughput assays, i.e. to evaluate multiple conditions at the same time using 96-well or 380-well plates. Moreover, the method is designed to be carried out on real-time PCR equipment, allowing same-day results to be obtained at low cost. In this

ensayos de alto rendimiento, es decir, evaluar al mismo tiempo múltiples condiciones utilizando placas de 96 o de 384 pozos. Por otro lado, el método está diseñado para llevarse a cabo en un equipo de PCR en tiempo real, lo cual permite obtener resultados en el mismo día a bajo costo. En este artículo se presentan los fundamentos de la técnica, así como los principales aspectos a considerar para realizar ensayos de TSA que incluyen el análisis y manejo de los datos para obtener los valores de $T_{m,app}$. Así mismo se presentan algunos ejemplos que describen los alcances de esta técnica.

Palabras claves: fluorimetría diferencial de barrido, ensayo de desplazamiento térmico, T_m , interacción proteína-ligando, descubrimiento de fármacos.

article, the principles of the technique are presented, as well as the main aspects to be taken into account when performing TSA assays, including data analysis and management to obtain $T_{m,app}$ values. Some examples describing the scope of this technique are also presented.

Keywords: differential scanning fluorometry, Thermal Shift Assay, T_m , protein-ligand interactions, drug discovery.

Introducción

La fluorimetría diferencial de barrido (1) también conocida como ensayo de desplazamiento térmico (*Thermal Shift Assay*, TSA). Es un método que permite la determinación rápida de la temperatura de fusión aparente de una proteína ($T_{m,app}$) y consiste en monitorear su estabilidad térmica por medio de fluorescencia extrínseca, ya sea usando una sonda fluorescente que se une a las regiones hidrofóbicas de la proteína, o bien midiendo los cambios en la fluorescencia intrínseca (NanoDSF) de la proteína.

La fluorimetría diferencial de barrido surgió debido a la necesidad de monitorear de una forma rápida y con ensayos de alto rendimiento, grandes quimiotecas de compuestos con el interés de identificar nuevas moléculas bioactivas. En los últimos años, esta técnica ha tenido numerosas aplicaciones entre las que se incluyen, el estudio de las interacciones proteína-ligando (2), la búsqueda de las condiciones óptimas de almacenamiento y estabilidad de proteínas usando diferentes amortiguadores, pHs, sales y aditivos con la finalidad de aumentar la probabilidad de éxito en la cristalización de proteínas (3) y se ha utilizado también para evaluar el efecto de mutaciones en la termoestabilidad de las proteínas mutantes con respecto a las proteínas silvestres (4, 5)

Origen del TSA

Antes del surgimiento de la técnica de TSA, las interacciones proteína-proteína, la estabilidad y el desplegamiento de proteínas se evaluaban principalmente por técnicas biofísicas que incluían métodos espectroscópicos como la fluorescencia intrínseca debido a residuos de triptófano, la

fluorescencia extrínseca utilizando como sonda el ANS y el dicroísmo circular (6). Así mismo, la calorimetría diferencial de barrido (DSC) ha sido ampliamente utilizada para calcular las temperaturas de desnaturalización de las proteínas sin el requerimiento de una sonda fluorescente (7, 8) y la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) ha sido ampliamente utilizada en el estudio de las interacciones de las proteínas con ligandos pequeños en donde se pueden obtener parámetros termodinámicos que describen con exactitud una interacción de interés (9). Ambas técnicas calorimétricas proveen de información útil para el análisis de la estabilidad de proteínas, así como su interacción con ligandos; sin embargo, ambos métodos requieren cantidades importantes de proteína, un análisis extensivo de los datos y son de bajo rendimiento lo que se traduce en la evaluación de una condición experimental por ensayo. Por último, en el caso de la ITC, el equipo requerido es altamente costoso, que constituye una de las principales desventajas de este método.

Debido a la necesidad de analizar muchas muestras en un mismo experimento, Pantoliano y colaboradores (10) introdujeron un nuevo sistema para evaluar el desplazamiento térmico de diferentes proteínas generado por grandes bibliotecas de compuestos. La técnica desarrollada consistía en realizar un monitoreo de un gran número de muestras utilizando placas de 96 o 384 pocillos, en un equipo con capacidad de leer fluorescencia con el fin de monitorear el desplegamiento de proteínas; así mismo el equipo a utilizar debería permitir realizar gradientes de temperatura para poder evaluar múltiples condiciones, con diferentes ligandos y a la vez utilizar diferentes concentraciones del ligando en un solo experimento. Esto generó una gran

aceptación entre los investigadores que podían usar equipos como el termociclador en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) que cumple con estas características. Niessen *et al* (11) mejoraron el protocolo gracias a la accesibilidad del equipo y a la presencia de colorantes más sensibles. Actualmente se usa el colorante *SYPRO orange* que tiene una excitación a 488 nm y una emisión de 500-610 nm. También se puede usar este método con la fluorescencia intrínseca de la proteína, conocido como nano DSF, sin embargo, este método depende de la cantidad de triptófanos que tenga la proteína.

El ensayo de TS es un método que tiene grandes ventajas como el poder hacer ensayos de alto rendimiento, con bajas cantidades de proteína, utilizando reactivos e instrumentos disponibles casi en cualquier laboratorio de investigación. Así mismo, el equipo de RT-PCR es fácil de usar y existen algunas alternativas tanto comerciales como gratuitas para el procesamiento de los datos. Dentro de las desventajas que presenta esta técnica es la obtención de falsos positivos o negativos, en segundo lugar, que la señal de fluorescencia depende de un colorante como el *SYPRO orange* así como de la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en la proteína de estudio. En el caso de que los resultados generados por el ensayo de desplazamiento térmico no sean claros o contundentes es recomendable el uso de otras técnicas que confirmen los resultados.

Fundamentos del TSA

El ensayo de desplazamiento térmico se basa en las interacciones del fluoróforo *SYPRO orange* con las regiones expuestas de las proteínas parcialmente desplegadas ricas en aminoácidos hidrofóbicos (Fig. 1). Las proteínas se encuentran en equilibrio termodinámico entre el estado plegado y el desplegado (12); en el estado plegado, los aminoácidos hidrofóbicos no están expuestos al solvente ya que se encuentran ocultos en las regiones estructuradas de los dominios centrales en las proteínas. El aumento en la energía de su medio ambiente, por ejemplo, cuando la temperatura aumenta, ocasiona que la proteína se vaya al estado desplegado, esta desnaturalización expone los residuos hidrofóbicos dando oportunidad a que el colorante *SYPRO orange* se una y por lo tanto se produzca un aumento de la fluorescencia, la longitud de onda de excitación de este colorante es de 490 nm y la de emisión a 575-610 nm (11,13). Debido a esta transición entre el estado plegado y desplegado de la proteína visualizado por el aumento de la fluorescencia del *SYPRO orange*, es posible determinar la temperatura media de desnaturalización

($T_{m,app}$) a partir de la gráfica del incremento de fluorescencia versus el incremento de temperatura. La $T_{m,app}$ se define como la temperatura a la cual el 50 % de la proteína está plegada y el otro 50% está desplegada (14).

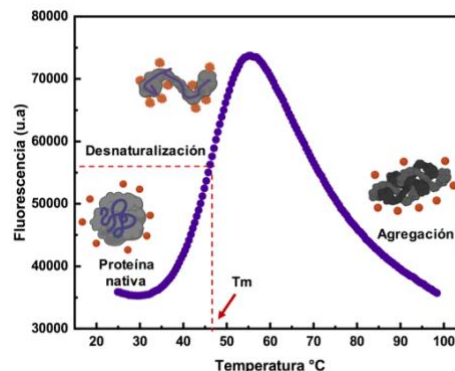


Figura 1. Curva de desnaturalización de una proteína por incremento de la temperatura seguida por fluorescencia del colorante *SYPRO orange*.

La $T_{m,app}$ refleja la estabilidad térmica de una proteína en una condición experimental particular y puede proporcionar indicadores útiles en varias aplicaciones. Por ejemplo, en la cristalografía de proteínas por rayos X, las T_m 's obtenidas por TSA son utilizadas para definir cuál es el mejor amortiguador y las mejores condiciones de pH y concentraciones de sales en las que se obtengan mayores valores de $T_{m,app}$. Este ensayo también se utiliza para evaluar el uso de aditivos para aumentar la estabilidad de las proteínas de interés con el fin de promover su cristalización.

El TSA es ampliamente utilizado para la identificación de ligandos que interactúan con proteínas en el enfoque de búsqueda de nuevos fármacos, de tal forma que mediante TSA se pueden evaluar los cambios en el ambiente de una proteína generados por dichas interacciones. Por ejemplo, la presencia de aniones o cationes específicos o la formación de complejos con otras moléculas, pueden estabilizar a una proteína a través de la reducción de la energía libre de Gibbs del complejo, creándose así nuevas interacciones moleculares o un reordenamiento conformacional de la proteína que puede provocar una estabilización de la proteína y como consecuencia un aumento en la $T_{m,app}$ (desplazamiento positivo). De esta forma el cálculo de las diferencias en los valores de $T_{m,app}$ (ΔT_m) en presencia de ligandos comparado con los de la proteína sola (en su forma apo) son indicativos de interacciones proteína-ligando.

Métodos para determinar la T_m

En teoría, los valores de T_{m,app} se pueden obtener de una manera sencilla graficando los valores de fluorescencia versus la temperatura y determinando el punto medio de la transición. Sin embargo, para los experimentos de alto rendimiento (*high-throughput*) en donde se analizan muchas muestras a la vez, la determinación de la T_{m,app} de manera manual puede llevar mucho tiempo.

Para determinar la T_{m,app}, se han utilizado principalmente dos métodos: (i) mediante la obtención de la primera derivada y (ii) mediante el ajuste de los datos a la ecuación de Boltzman. Sin embargo, los valores de T_{m,app} obtenidos por ambos métodos pueden ser diferentes entre sí. La desnaturalización térmica de una proteína típica sigue

un comportamiento sigmoidal (Fig. 2a), en donde el punto medio de la transición, que es el punto de inflexión de la curva sigmoidal define la T_{m,app} del proceso de desnaturalización. La tangente del punto de inflexión de la curva sigmoidal tiene la pendiente más pronunciada, de esta forma, la primera derivada determina este punto buscando el pico de la curva del inverso de la primera derivada (Fig. 2b). En este método, la primera derivada de cada punto se calcula con la Ec. 1, donde f(T_n) corresponde al valor promedio de varios puntos vecinos para reducir el ruido de los datos crudos. En el método del ajuste de la curva se utiliza una función sigmoidal, usualmente la ecuación de Boltzman (Ec. 2), para ajustar la curva de desnaturalización térmica de la proteína y obtener el valor de T_{m,app} a partir del punto de inflexión (Fig. 2c).

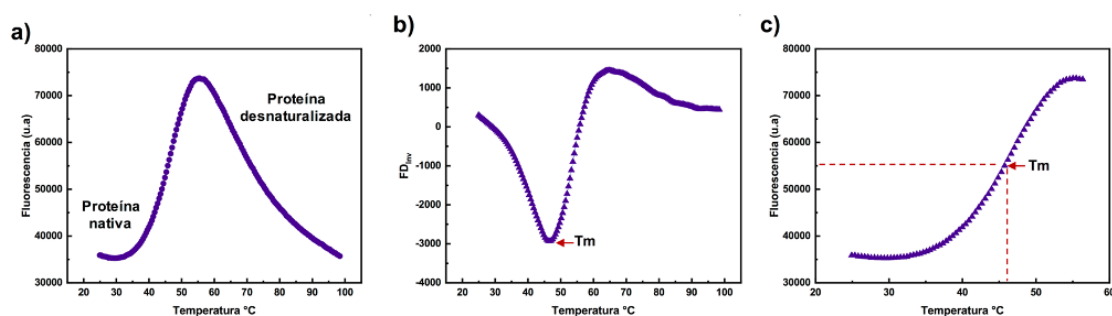


Figura 2. Gráficas que describen la desnaturalización de una proteína por incremento de la temperatura. a) Comportamiento sigmoidal que obedece a un aumento de la fluorescencia conforme la proteína se despliega y desciende cuando la proteína se agrega, b) Inverso de la primera derivada en donde el mínimo corresponde a la T_{m,app}, c) Ajuste de la curva a la ecuación de Boltzman.

Ecuación 1.

$$1) \quad FD_{inv}(T_n) = - \frac{\int (T_{n+1}) - \int (T_{n-1})}{2\Delta T}$$

Ecuación 2.

$$2) \quad \int (T) = \int_{min} + \frac{\int_{max} - \int_{min}}{1 + \exp \frac{T_m - T}{a}}$$

Los métodos de ajuste de la curva a una función sigmoidal son más robustos y menos sensibles al

ruido aleatorio en comparación con el método de la primera derivada (15). Para facilitar el análisis de los datos de TSA se han desarrollado varias herramientas de software tanto comerciales como gratuitas entre los que se encuentran programas como *ThermoQ analytical* (16), *Meltdown* (17), *MTSA* (18), y *DMAN* (19); sin embargo, estas herramientas tienen algunas limitantes de compatibilidad con el sistema operativo, restricciones de uso libre y el uso de algoritmos que no pueden eliminar ruido de la muestra y por lo tanto proporcionan valores de T_{m,app} imprecisos. Recientemente, Lee PH y colaboradores diseñaron la herramienta TSA-CRAFT (*Thermal Shift Assay-Curve Rapid and Automatic Fitting Tool*) que se caracteriza por ser una herramienta gratuita y robusta para el análisis de datos de ensayo de desplazamiento térmico de alto rendimiento, en donde se pueden analizar varias muestras a la vez (15). Al final de la siguiente sección se describirá de manera general el uso de esta plataforma para el análisis de datos provenientes de ensayos de desplazamiento térmico.

Materiales y Métodos

Para llevar a cabo los ensayos de TSA se requiere tener la proteína de interés purificada a homogeneidad, definir el tipo de experimento a realizar, ya sea que se pretenda conocer la $T_{m,app}$ de la proteína de interés o bien evaluar su estabilidad en diferentes amortiguadores y diferentes valores de pH. Así mismo, se puede evaluar la afinidad de un sustrato o análogo de sustrato, así como el uso de diferentes ligandos, como por ejemplo fármacos para

evaluar su efecto en la $T_{m,app}$. Además, mediante esta técnica se pueden buscar las condiciones ideales en las cuales la proteína de interés sea más estable con la finalidad de obtener cristales de buena calidad.

Una vez que se obtienen los valores de fluorescencia en las diferentes temperaturas evaluadas, se requieren procesar los datos usando diferentes programas (comerciales o gratuitos) para calcular los valores de $T_{m,app}$ (Fig. 3).

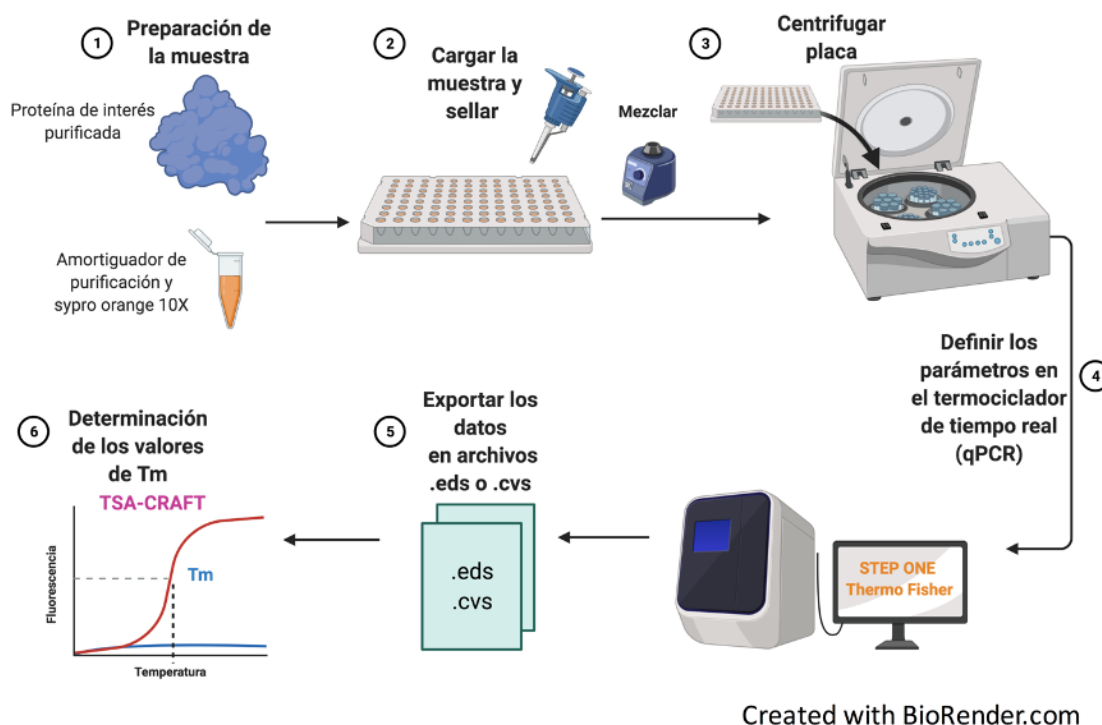


Figura 3. Procedimiento para el desarrollo del ensayo de desplazamiento térmico.

Equipo

- Termociclador PCR en tiempo real StepOne plus para placa de 96 pozos (antes Applied Biosystems)
- Centrífuga para placas
- Vórtex

Materiales

- Placa óptica de 96 pozos MicroAmp[®] Fast Optical 96 'well Reaction Plate with Barcode (0.1 mL) o placas de 96 pozos compatibles con el equipo de PCR en tiempo real.

- Cubierta para placas ThermalSeal RTS[™] Sealing o cubiertas compatibles para placas de 96 pozos.
- Micropipetas de 2, 20, 200 μ L
- Micropipetas multicanal 10 y 200 μ L
- Puntas para micropipetas adecuadas
- Microtubos 0.6 mL

Reactivos

- Proteína blanco purificada a homogeneidad a una concentración aproximada de 2 mg/mL.
- Proteína control.
- Sustratos, ligandos o inhibidores.
- Colorante Fluorescente SYPRO Orange 5000X (Sigma).

Opcionales

- KIT de amortiguadores (Hampton Research)
- KIT de sales y Osmolitos (Hampton Research)
- Sustratos, ligandos o inhibidores

Otros

- *Software Step One ThermoFisher*
- *Software TSA-CRAFT*
- *Origin, Graphpad Prism*

Controles importantes

- *SYPRO Orange* 8X ó 10X + Amortiguador de purificación (volumen final 10 μ L)
- Proteína (problema y control) + Amortiguador de purificación
- Ligando, osmolito, sustrato o inhibidor + Amortiguador de purificación

Procedimiento

A) Preparación de la muestra

1. Evaluar diferentes concentraciones de proteína hasta encontrar la concentración adecuada, a partir de un stock de proteína purificada de 2 mg/mL (concentración sugerida) en un rango de concentraciones 0.2- 1 μ g/mL. Esta concentración depende de la proteína de estudio y se recomienda utilizar la mínima concentración de proteína en donde la $T_{m_{app}}$ se mantiene constante.

2. Ensayo para la determinación de $T_{m_{app}}$. Agregar 1 o 2 μ L de proteína de interés a la concentración probada anteriormente + 9 u 8 μ L del buffer de purificación con *SYPRO orange* a una concentración final 10X. Hacer el ensayo preferentemente por triplicado. Vol. final 10 μ L

- 2a. Ensayo para la determinación de amortiguador y pHs óptimos
- Preparar solución stock de proteína en el amortiguador de purificación + *SYPRO orange*, tomando en cuenta el volumen necesario dependiendo la cantidad de amortiguadores a probar (p. Ej. en un rango de pH de 3-11, se harán 9 determinaciones por duplicado más controles por lo que se requerirá un volumen aproximado de 25 μ L).
 - Pipetear 9 μ L de cada amortiguador a evaluar en los pozos de las placas de 96 pozos hacerlo por duplicado, posteriormente

agregar 1 μ L de la proteína a evaluar (concentración probada y con *SYPRO orange*). Vol final 10 μ L.

- 2b. Ensayo para monitorear el efecto de sales, ligandos, osmolitos y fármacos. Repetir las condiciones descritas en 2a, agregando los amortiguadores con sales, ligandos, osmolitos o fármacos a evaluar y ajustar el volumen a 10 μ L.

3. Sellar perfectamente la placa de 96 pozos con la película adhesiva, de tal forma que no haya contaminación entre pozo y pozo. Agitar en vórtex suavemente y centrifugar por 2 min a 500 x g en la centrífuga de placas.

4. Poner la placa en el equipo de PCR tiempo real y usar el programa de STEP ONE qPCR (Thermo Fisher). Nota importante. Una vez que se han encontrado las condiciones adecuadas, repetir el experimento por triplicado, una variación de $\pm 2^\circ$ C se considera normal. Por cada corrida es necesario incluir los controles mencionados anteriormente.

B) Definir los parámetros en el termociclador de tiempo real

El análisis de las muestras contenidas en la placa se lleva a cabo en un termociclador de tiempo real (*STEP ONE plus*, Thermo Fisher) utilizando el programa *STEP ONE*. Una vez accediendo al programa, se despliega el Menú (“*Experiment menu*”) en donde se selecciona la opción “*Advanced Setup*”. En este nuevo apartado se mostrarán 4 secciones (Fig.4), las cuales servirán para ajustar los parámetros del experimento.



Figura 4.

En la sección “*Experiment Properties*”, se especifican los parámetros generales del experimento: nombre del archivo (Fig.5a), placa de 96 pozos, curva de desnaturalización, el colorante a utilizar en la determinación (otro) y establecer el tiempo de análisis a velocidad rápida (aproximadamente 40 min) (Fig.5b).

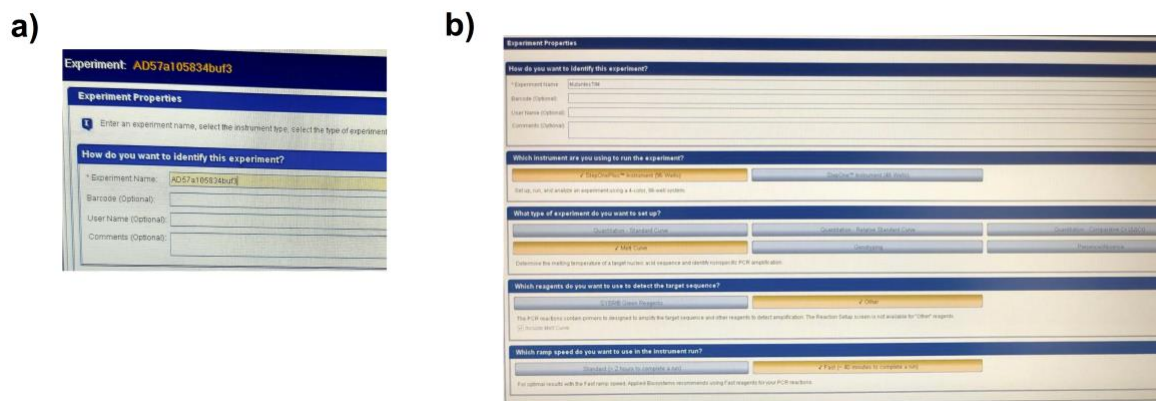


Figura 5.

La sección “*Plate set up*” (Fig. 6a) consta de 2 pestañas. En la sección “*Define Targets and Samples*” (Fig. 6b) se debe seleccionar a ROX (carboxi-X-rhodamina) como sonda reportera debido a que tiene longitudes de onda de excitación y emisión similares a las del *SYPRO Orange* y por último, se debe especificar que el análisis no contará con un apagador de la fluorescencia (Quencher).

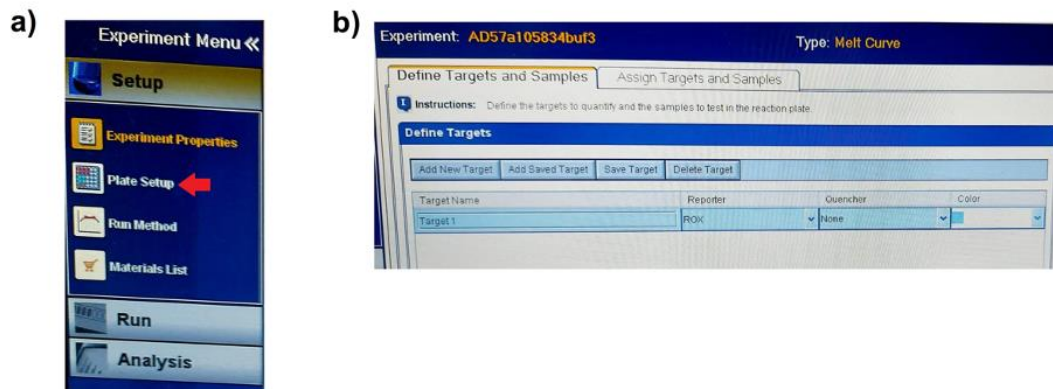


Figura 6.

La segunda pestaña “*Assign targets and Samples*” sirve para seleccionar los pozos de la placa que serán analizados. Para ello, se selecciona la opción “*View Plate Layout*” en dónde se despliegan los pozos de la placa (Fig.7a) y se deben seleccionar sólo aquéllos que se desean evaluar. En el panel de opciones (Fig.7b) se indica que no se empleará una sonda como referencia pasiva y se deben marcar las casillas para asignar los pozos como muestras y blancos.

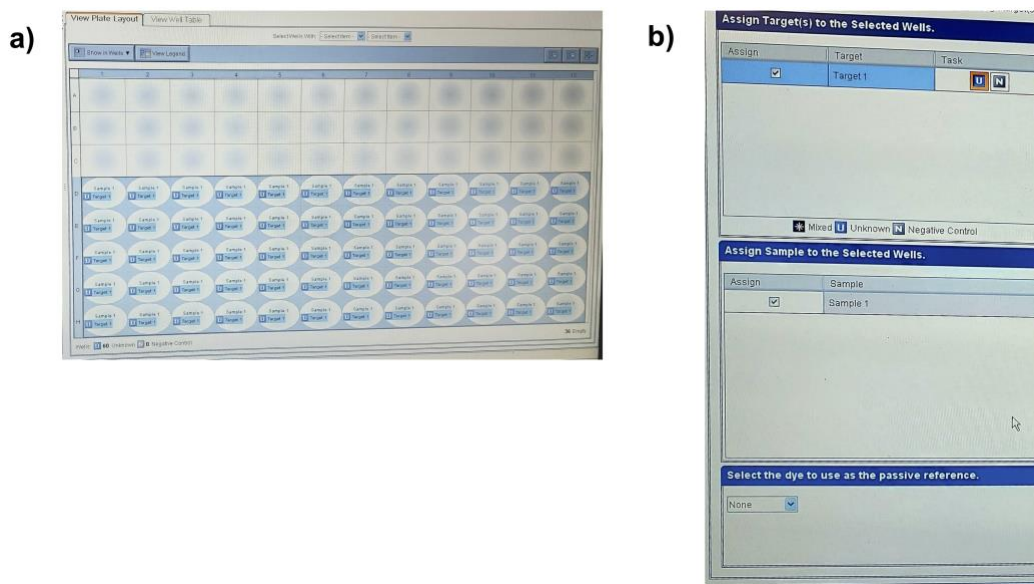


Figura 7.

De regreso en el menú principal, en el apartado “Run Method” (Fig.8a), en la opción “Open Run Method” se despliega una lista de métodos de análisis, en donde se selecciona la opción “Protein Thermal Shift Assay”, o bien se deben definir los parámetros utilizando las siguientes condiciones:

etapa de la curva de desplegamiento continua, intervalo de temperatura a utilizar (25 – 99.9 °C), con un incremento del 1%. Finalmente, se especifica el volumen de reacción de los pozos (10 µL) (Fig 8b).

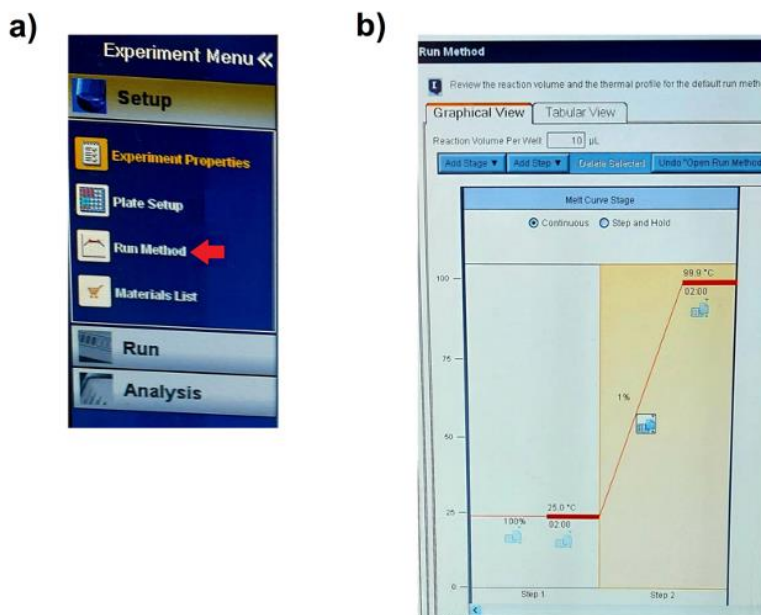


Figura 8.

Una vez que se han establecido los parámetros del experimento, se selecciona la opción “Start Run” y se muestra un contador que estima el tiempo de la corrida, inicialmente de 506 minutos y al poco

tiempo se ajusta a 49 min (Fig.9). Una vez concluido el análisis, el archivo se debe guardar con la extensión .eds para su posterior análisis.

C) Análisis de los datos y determinación de la $T_{m_{app}}$ utilizando TSA-CRAFT

Para el análisis de datos es importante obtener los valores de fluorescencia y temperatura de cada pozo analizado durante el experimento. El archivo obtenido a partir del ensayo con el programa STEP ONE en formato “.eds”, se debe analizar con el programa “*Design and Analysis Software v2.6, QuantStudio family, without instrument operation*”, el cual puede descargarse de manera gratuita desde la página de Thermo Fisher Scientific (Fig.10).

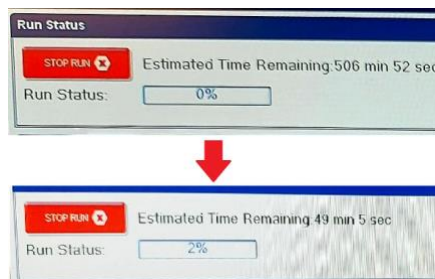


Figura 9.

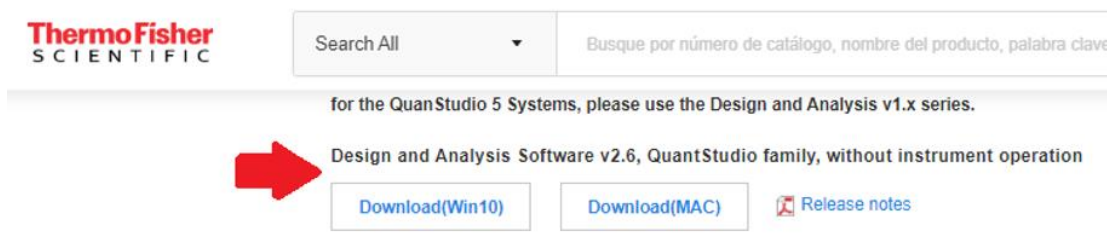


Figura 10.

Al abrir el archivo .eds con el programa *QuantStudio* se despliega la interface mostrada en la figura 11, en donde se selecciona en el apartado de “Actions” la opción de “*Primary Analysis Settings*”.

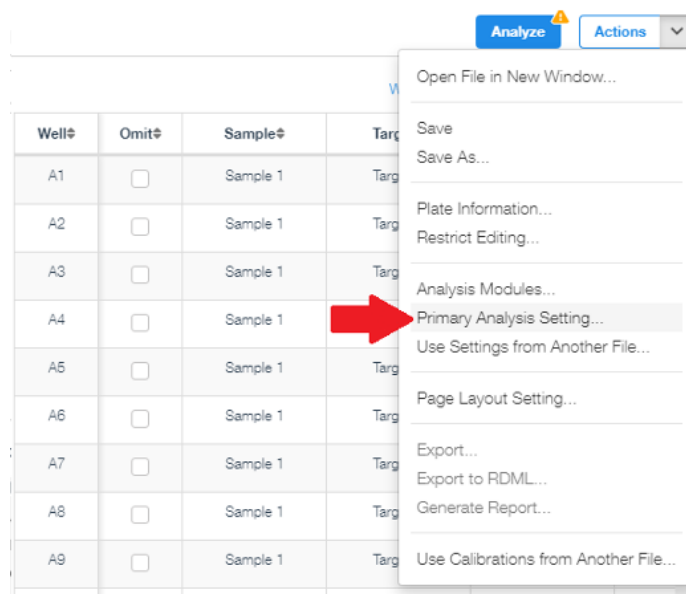


Figura 11.

En el apartado de “*Primary Analysis Settings*” (Fig.12) se selecciona “*Multi-Peak Calling*” tanto para Default como para *Target 1* y una vez que se guarda el archivo, el recuadro “*Analyze*” cambia de color, lo que indica que el análisis se llevó a cabo de forma adecuada.

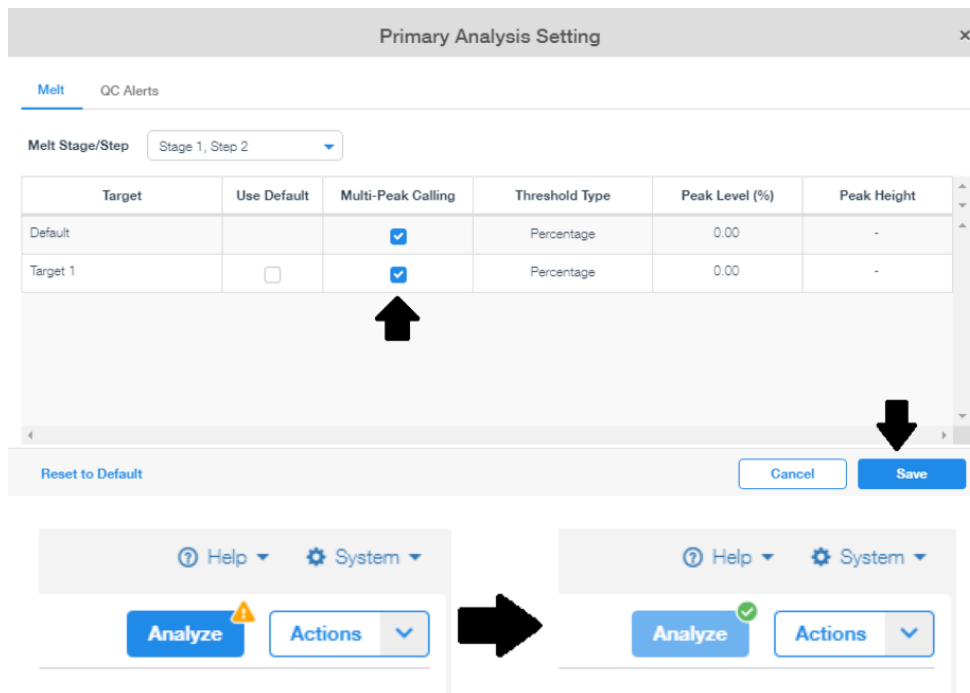


Figura 12.

Una vez finalizado el análisis, nuevamente en el apartado de "Actions" (Fig. 13a) seleccionar la opción de "Export" con el formato CVS. Una vez que el análisis se guarda en la carpeta de interés se generan 6 archivos (Figura 13b), de los cuales el

archivo "melt curve raw" contiene los valores de temperatura y fluorescencia de cada pozo analizado, necesarios para el análisis mediante el servidor TSA-CRAFT.

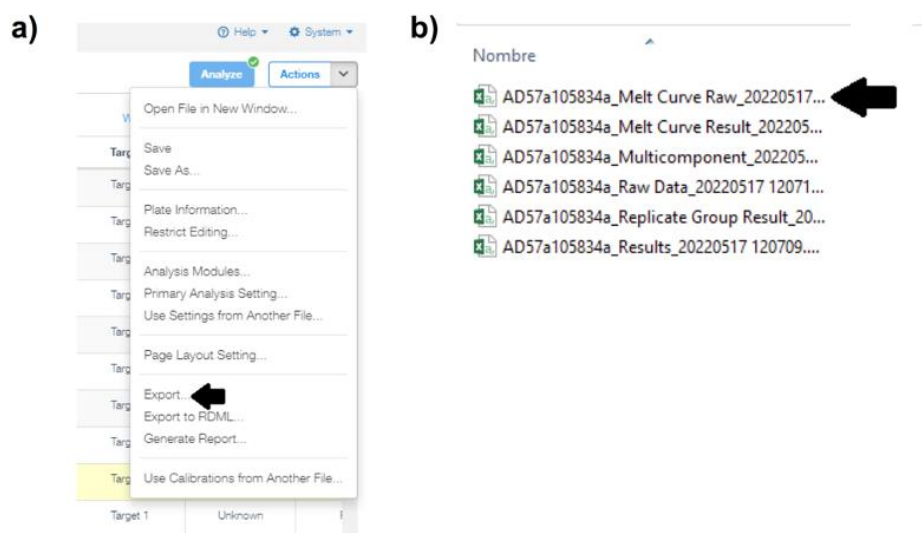


Figura 13.

El análisis de los datos del ensayo de TSA se lleva a cabo en el servidor en línea TSA-CRAFT desarrollado por Lee PH y colaboradores en el año 2019, al cual se puede acceder por medio del sig.

enlace: http://bioserv.cbs.cnrs.fr/TSA_CRAFT/. Una vez en el servidor (Fig.14), se debe especificar el nombre del proyecto sin espacios (*Screening name*).

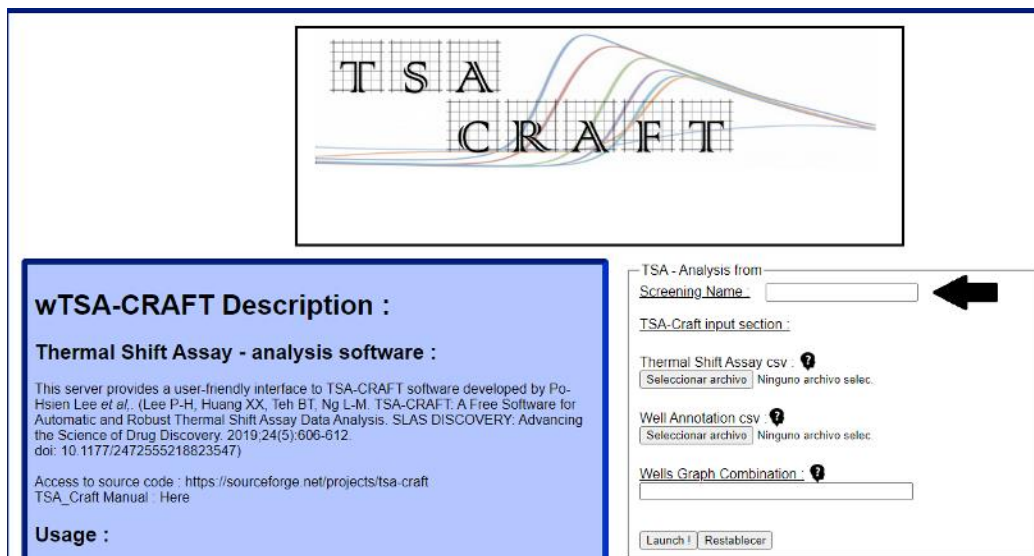


Figura 14.

Posteriormente, es necesario generar dos archivos en Excel que agrupen los valores de fluorescencia obtenidos en el programa *QuantStudio*, para analizarlos en el servidor TSA-CRAFT. Es recomendable descargar las plantillas proporcionadas por el servidor, al explorar en los símbolos de interrogación, en las secciones de “*Thermal Shift Assay csv*” y “*Well Annotation csv*” (Fig.15).

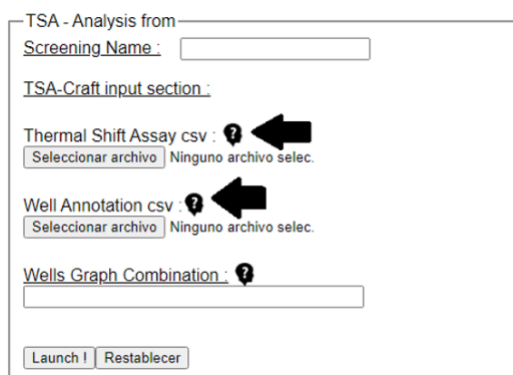


Figura 15.

La plantilla “*Thermal Shift Assay csv*” (Fig.16), muestra el orden de los valores de temperatura y fluorescencia. La primera columna corresponde a los valores de temperatura y en las columnas posteriores se deben añadir de manera consecutiva los valores de fluorescencia correspondientes a los pozos que se desean analizar; finalmente, los valores de fluorescencia de los blancos o referencias se deben colocar en las columnas siguientes a las que contengan los datos de las muestras.

| | A | B | C | D | E | F |
|----|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | Temperature | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 |
| 2 | 24.92392731 | 31737.6641 | 27286.8457 | 26876.3106 | 39347.5508 | 35890.6875 |
| 3 | 25.36679268 | 31575.8203 | 27147.4629 | 26789.4395 | 39129.2578 | 35862.3242 |
| 4 | 25.80965614 | 31436.0645 | 26938.7363 | 26597.8535 | 38946.7148 | 35662.9609 |
| 5 | 26.25252151 | 31218.9766 | 26761.0371 | 26485.8457 | 38759.8008 | 35633.8438 |
| 6 | 26.69538498 | 31187.877 | 26653.0508 | 26380.3691 | 38601.6719 | 35552.3047 |
| 7 | 27.13824844 | 30931.1875 | 26478.1973 | 26244.3281 | 38415.6484 | 35496.2617 |
| 8 | 27.58111382 | 30780.0098 | 26298.0645 | 26139.9688 | 38283.3633 | 35339.9688 |
| 9 | 28.02397919 | 30579.8574 | 26157.9238 | 26053.7891 | 38125.1836 | 35366.4141 |
| 10 | 28.46684265 | 30276.2617 | 26006.334 | 25974.7129 | 38006.5195 | 35297.8008 |
| 11 | 28.90970612 | 30183.5332 | 25832.9375 | 25833.0078 | 37899.7578 | 35294.8633 |
| 12 | 29.35256958 | 29987.7461 | 25743.7383 | 25748.168 | 37751.4297 | 35273.5859 |
| 13 | 29.79543495 | 29976.3125 | 25595.2949 | 25733.6699 | 37668.1133 | 35262.8867 |
| 14 | 30.23830032 | 29753.1387 | 25527.7617 | 25623.457 | 37524.5273 | 35291.8359 |
| 15 | 30.68116379 | 29648.9688 | 25388.7148 | 25590.3008 | 37482.2305 | 35343.5586 |

Figura 16.

En la plantilla “*Well Annotation csv*” (Fig.17), se deben especificar los nombres de las columnas que serán analizados de la plantilla anterior. En la columna “*Well index*” se indica la letra de la columna y el número de fila, en esta sección es importante conservar todas las columnas existentes en la plantilla aunque no sean requeridas, aquéllas que no vayan a ser utilizados se dejan en blanco.

En la columna “*Annotation*” se coloca el nombre de la muestra y finalmente en “*Reference*” se debe colocar los pozos donde se encuentran las muestras de referencia.

En caso de tener más de un experimento en la placa, se recomienda tener una plantilla “*Thermal Shift Assay csv*” y “*Well Annotation csv*” para cada

experimento y analizarlos de forma individual, con el objetivo de evitar el entrecruzamiento de datos.

| | A | B | C |
|---|-------------|-----------------|-----------------------|
| 1 | #Well_index | #Annotation | #Reference_well_index |
| 2 | A1 | 57a10 2 micro g | G1 H1 |
| 3 | A2 | 57a10 2 micro g | G1 H1 |
| 4 | A3 | 57a10 4 micro g | G1 H1 |
| 5 | A4 | 57a10 4 micro g | G1 H1 |
| 6 | A5 | 57a10 6 micro g | G1 H1 |
| 7 | A6 | 57a10 6 micro g | G1 H1 |

Figura 17.

Figura 18.

Una vez que se generan ambos archivos, se cargan en el servidor TSA-CRAFT (Fig 18). En el apartado “Wells Graph Combination”, se puede señalar aquellas columnas cuyas gráficas se deseen combinar para comparar -para lo cual se debe especificar letra de columna y número de fila separados por comas- pudiéndose combinar un máximo de 8 gráficas.

Una vez con todos los datos especificados se procede a la opción “Launch” y el servidor redireccionará a la página con el análisis de los resultados (Fig.19).

En esta sección se presenta la información de cada uno de las columnas analizadas que corresponde a los pozos contenidos en la placa de análisis. Cada recuadro permite consultar los valores analizados (“Data”) y la gráfica de cada pozo (“Figure”).

Finalmente, la opción “download results.zip” nos proporcionara un archivo en formato zip, que contiene un archivo en formato .html y una carpeta que incluye todas las imágenes generadas por el servidor.

[Curve Fitting Results](#)
[Thermal Shift Analysis](#)
[Download Results.zip](#)

Overlay Combinations

-> Wells Overlaying <-

Curve Fitting Results (csv format)

| 96 well | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---------|--|--|--|--|--|--|-----|-----|
| | A1 57a10 2 micro g Tm : 46.6392 R ² : 0.9981 ΔTm : -48.2350 | A2 57a10 2 micro g Tm : 46.4053 R ² : 0.9993 ΔTm : -48.4689 | A3 57a10 4 micro g Tm : 46.1871 R ² : 0.9993 ΔTm : -48.6871 | A4 57a10 4 micro g Tm : 46.3556 R ² : 0.9993 ΔTm : -48.5186 | A5 57a10 6 micro g Tm : 45.8061 R ² : 0.9992 ΔTm : -49.0681 | A6 57a10 6 micro g Tm : 45.7579 R ² : 0.9992 ΔTm : -49.1163 | N/A | N/A |
| A | Data Figure | Data Figure | Data Figure | Data Figure | Data Figure | Data Figure | | |

Figura 19.

Aplicaciones del TSA

Existe una gran variedad de aplicaciones de esta técnica, se ha utilizado en la búsqueda de moléculas que puedan utilizarse como candidatos a fármacos y en el análisis de ligandos o anticuerpos que se unan a determinadas proteínas. De igual manera, esta técnica se ha usado para encontrar las condiciones óptimas

de almacenamiento que favorezcan la estabilidad de las proteínas o bien para el mantenimiento de las interacciones proteína-ligando. Otro campo de aplicación de esta técnica consiste en la búsqueda de las condiciones adecuadas para la cristalización de proteínas, así como en la observación del efecto de mutaciones en la estabilidad, como sucede en algunas

enfermedades relacionadas con la presencia de mutaciones, inserciones o deleciones.

En este apartado se describirán brevemente algunos trabajos realizados en nuestros laboratorios de investigación en donde se han aplicado de manera exitosa el TSA en distintos acercamientos en la caracterización de proteínas.

Comparación de la estabilidad de diferentes mutantes de la triosafosfato isomerasa

La deficiencia de la triosafosfato isomerasa (TIM) es una enfermedad rara en el humano causada por la presencia de mutaciones que son heredadas por alguno de los padres. La presencia de una o varias mutaciones en esta proteína puede llegar a ocasionar la muerte en niños. La severidad de esta enfermedad

está relacionada con el aminoácido que se substituye en la posición original de la enzima. En el estudio reportado por Cabrera N., en el 2019 (4) se estudiaron 9 enzimas mutantes recombinantes con las sustituciones reportadas que producen la enfermedad en humano. Se estudió la estabilidad térmica de cada una de ellas mediante TSA comparando la $T_{m,app}$ con respecto a la obtenida en la enzima silvestre. En la Fig. 20 se observa que las proteínas HsTIMC41Y, HsTIMG72A y HsTIME104D muestran una diferencia en sus valores de $T_{m,app}$ de más de 10 °C comparados con la obtenida para la enzima silvestre. Los valores de $T_{m,app}$ para estas enzimas se encontraron entre 49.7 y 51.5 °C, demostrando que esas sustituciones afectaron fuertemente a la estabilidad térmica de la enzima.

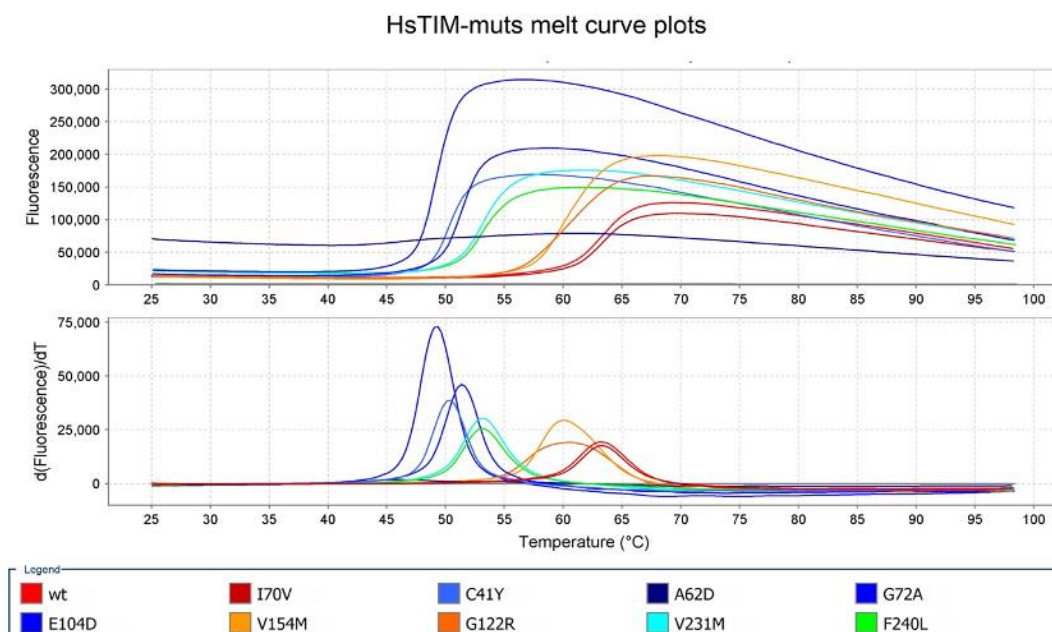


Fig. 20. Curvas de desnaturación térmica de diversas mutantes de HsTIM seguidas por TSA. Tomado y modificado de (4).

Termoestabilidad de una séptuple mutante de la proteasa del virus del tabaco (TEVp)

La proteasa del virus del tabaco (TEVp) es ampliamente utilizada para remover etiquetas y proteínas de fusión de las proteínas recombinantes; sin embargo, existen algunas limitaciones inherentes a su producción, entre las que se incluyen baja solubilidad, autoproteólisis e inestabilidad (21). Se han estudiado diversas mutaciones tanto de manera puntual como en combinación de no más de 5, con el fin de mejorar la estabilidad y los rendimientos de

producción de esta proteasa (22). Recientemente, se reportó la mutante TEVp7M que contiene en su secuencia de aminoácidos 7 cambios que favorecieron su producción de manera soluble, con buenos rendimientos de purificación y un notable incremento en su estabilidad (5). La termoestabilidad de la TEVp7M fue analizada por TSA y comparada con la obtenida para la mutante TEVp-S219V, de esta manera se pudo evidenciar que la $T_{m,app}$ de la séptuple mutante presentó ligeras variaciones en el rango de pH de estudio (pH 6-9), mostrando una diferencia de 4 °C, entre los valores de $T_{m,app}$ más

alto (52 °C, pH 8) y más bajo (48 °C, pH 9). Por otro lado, los valores de $T_{m,app}$ obtenidos para la mutante S219V, varían 12 °C entre el valor más alto (48 °C, pH 7) y el valor más bajo (36 °C) (Fig. 21). De esta forma, en este trabajo se demostró que las mutaciones incorporadas contribuyeron a una mayor estabilidad de la mutante TEVp7M y gracias al ensayo de TSA se pudo determinar que entre pH 7 y 8, esta mutante es bastante estable para poder llevar a cabo la proteólisis de manera eficiente.

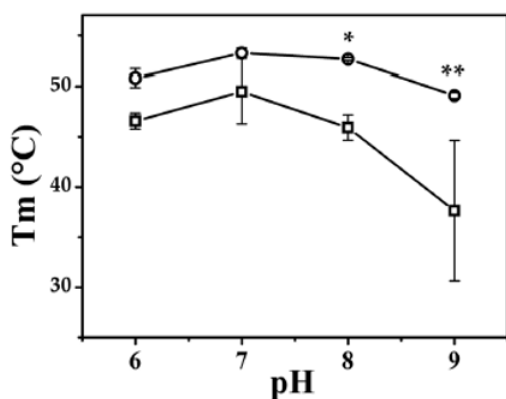


Figura 21. Comparación de la termostabilidad de las mutantes de TEVp S219V y TEVp7M en un rango de pH de 6-9 seguida por TSA. Tomado de (5).

Cálculo de la constante de disociación de una proteína (K_d) mediante TSA

El TSA es una herramienta útil en la caracterización de la unión de ligandos en los sitios activos o alostéricos de diversas proteínas. De esta forma, se ha utilizado para determinar las constantes de disociación (K_d). Recientemente, Bhayani y Ballicora (23) propusieron un método cuantitativo para determinar valores de K_d a partir de los datos generados por TSA. Este método incluye un modelo al equilibrio derivado de la ecuación de van't Hoff que relaciona los valores de $T_{m,app}$ versus el logaritmo de la concentración del ligando para calcular la K_d . Como ejemplo del uso de TSA en la determinación de esta constante, presentamos experimentos realizados con la triosafosfato isomerasa de humano (HsTIM) caracterizando la unión de un análogo del estado de transición, el 2-fosfoglicolato (2PG) mediante TSA (datos no publicados).

Para la realización de estos experimentos se usaron diferentes concentraciones (de 0 a 0.5 mM) del 2PG. Para cada concentración utilizada se obtuvo una $T_{m,app}$ y mediante un gráfico de la concentración del análogo de sustrato en escala logarítmica versus los valores de $T_{m,app}$ obtenidos, se determinó la K_d

(Fig. 22), para ello la curva obtenida se ajustó a la ecuación de van't Hoff (23). De esta manera, se pudo conocer que la constante de disociación del 2PG a la HsTIM es de 0.009 mM.

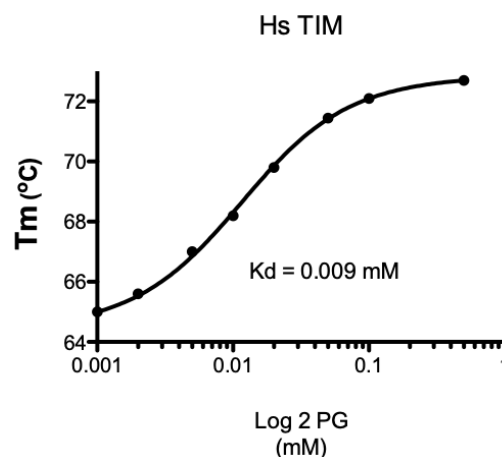


Figura 22. Determinación de la K_d del 2PG a la HsTIM mediante la obtención de los valores de $T_{m,app}$ por TSA.

Uso de osmolitos como estabilizantes de proteínas

Los osmolitos son compuestos de bajo peso molecular que tienen como función principal mantener la integridad de las células cuando se ven afectadas en su viscosidad, punto de fusión y fuerza iónica en la solución acuosa que las contiene, por esta razón los osmolitos son muy usados en investigación para evitar la agregación o el mal plegamiento de las proteínas (24).

Como ejemplo del uso de estas moléculas, en el trabajo realizado por el Dr. Alejandro Madrigal Carrillo (datos no publicados) se usó el N-óxido de trimetilamina (TMAO) como osmolito estabilizante de la RNasa P bacteriana. Esta ribonucleasa es conocida como una proteína intrínsecamente desordenada, lo que hace imposible hacer estudios biofísicos y bioquímicos con ella. Henkels y colaboradores demostraron que la adición del TMAO estabiliza a la proteína, pudiéndose detectar estructura secundaria (25, 26) y Madrigal-Carrillo A. demostró que una concentración entre 1 y 2 M de TMAO logra estabilizar de tal forma a la RNasa P, que permitió obtener curvas de desnaturalización seguidas por TSA, arrojando valores de $T_{m,app}$ cercanas a los 80 °C (Fig. 23b), mientras que en ausencia del estabilizador las gráficas obtenidas de desnaturalización no se definen adecuadamente (Fig. 23a).

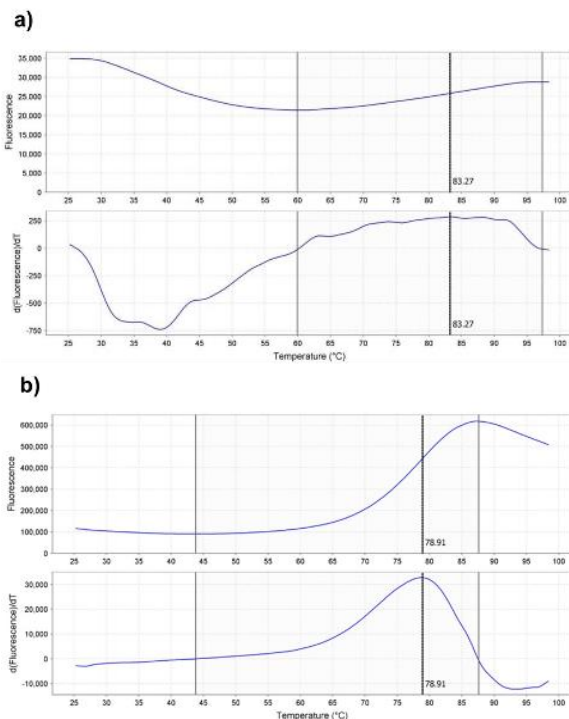


Figura 23. Curvas de desnaturalización térmica de la RNasa P bacteriana obtenidas mediante TSA en ausencia (a) y presencia de 1 M de TMAO (b).

Conclusiones

El ensayo de desplazamiento térmico es un método que nos permite conocer la temperatura de fusión aparente de una proteína mediante el uso de un compuesto fluorescente que se une a sus regiones hidrofóbicas. Es una técnica robusta que tiene una gran cantidad de aplicaciones; se ha usado para

detectar amortiguadores, mutaciones o ligandos que afectan la estabilidad térmica de la proteína de interés, también se pueden determinar las condiciones óptimas de almacenamiento de proteínas o bien realizar una caracterización funcional así como mejorar las tasas de éxito en la purificación de proteínas y cristalización.

Es una técnica que tiene grandes ventajas metodológicas como es la baja cantidad (concentración y volumen) de proteína que se requiere, es económica, rápida y se pueden hacer ensayos de alto rendimiento de 96 a 310 pozos que permiten monitorear una gran cantidad de variables al mismo tiempo.

En este trabajo se mostraron ejemplos exitosos del uso de esta técnica, como fue conocer la constante de disociación y la estabilidad térmica de diferentes mutantes de la triosafosfato isomerasa, el uso de diferentes pHs en mutantes de la proteasa recombinante del virus del tabaco y el uso de osmolitos para estabilizar la Rnasa P bacteriana. Como todas las técnicas, el ensayo de desplazamiento térmico tiene sus limitaciones, la principal es el uso de un colorante externo que puede llegar a limitar la interpretación de datos, especialmente cuando se desean monitorear ligandos. El éxito de esta técnica es proteína-dependiente, es decir las características del tamaño, estado oligomérico y cantidad de aminoácidos aromáticos expuestos al solvente influyen en un buen resultado.

Referencias

- Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas', A. F., & Gilmanshin, R. I. (1991). Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, 31(1), 119–128. <https://doi.org/10.1002/bip.360310111>
- Baljinnyam, B., Ronzetti, M., Yasgar, A., & Simeonov, A. (2020). Applications of Differential Scanning Fluorometry and Related Technologies in Characterization of Protein-Ligand Interactions. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2089, 47–68. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0163-1_4
- Huynh, K., & Partch, C. L. (2015). Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Current protocols in protein science*, 79, 28.9.1–28.9.14. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2809s79>
- Cabrera, N., Torres-Larios, A., García-Torres, I., Enríquez-Flores, S., & Perez-Montfort, R. (2018). Differential effects on enzyme stability and kinetic parameters of mutants related to human triosephosphate isomerase deficiency. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1862(6), 1401–1409. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.03.019>
- Enríquez-Flores, S., De la Mora-De la Mora, J. I., Flores-López, L. A., Cabrera, N., Fernández-Lainez, C., Hernández-Alcántara, G., Guerrero-Beltrán, C. E., López-Velázquez, G., & García-Torres, I. (2022). Improved yield, stability, and cleavage reaction of a novel tobacco etch virus protease mutant. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(4), 1475–1492. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11786-5>
- Reed, C. J., Bushnell, S., & Evilia, C. (2014). Circular dichroism and fluorescence spectroscopy of cysteinyl-tRNA synthetase from *Halobacterium salinarum* ssp. NRC-1 demonstrates that group I cations are particularly effective in providing structure and stability to this halophilic protein. *PLoS one*, 9(3), e89452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089452>
- Sturtevant J. M. (1977). Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(6), 2236–2240. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.6.2236>
- Chiu, M. H., & Prenner, E. J. (2011). Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 3(1), 39–59. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76463>

9. Falconer, R. J., Schuur, B., & Mittermaier, A. K. (2021). Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research from 2016 to 2020. *Journal of molecular recognition* : JMR, 34(10), e2901. <https://doi.org/10.1002/jmr.2901>
10. Pantoliano MW, Rhind AW, Salemm FR, Springer BA, Bone R, Petrella EC: Microplate thermal shift assay and apparatus for lig- and development and multi-variable protein chemistry optimization. *International Patent Appl. No. PCT/US97/08154. Publ. No. WO 97/42500, 1997.*
11. Niesen, F. H., Berglund, H., & Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature protocols*, 2(9), 2212–2221. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.321>
12. Bowling, J. J., Shadrick, W. R., & Lee, E. C. G. a. E. (2016). Going Small: Using Biophysical Screening to Implement Fragment Based Drug Discovery. In T. Chen, & S. C. Chai (Eds.), *Special Topics in Drug Discovery*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/66423>
13. Abbott JA, Livingston NM, Egri SB, Guth E, Francklyn CS (2017). Characterization of aminoacyl-tRNA synthetase stability and substrate interaction by differential scanning fluorimetry. *Methods*;113:64-71. doi:10.1016/j.ymeth.2016.10.013
14. Lo, M. C., Aulabaugh, A., Jin, G., Cowling, R., Bard, J., Malamas, M., & Ellestad, G. (2004). Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Analytical biochemistry*, 332(1), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.04.031>
15. Lee, P. H., Huang, X. X., Teh, B. T., & Ng, L. M. (2019). TSA-CRAFT: A Free Software for Automatic and Robust Thermal Shift Assay Data Analysis. *SLAS discovery: advancing life sciences R & D*, 24(5), 606–612. <https://doi.org/10.1177/2472555218823547>
16. Phillips, K., & de la Peña, A. H. (2011). The combined use of the ThermoFluor assay and ThermoQ analytical software for the determination of protein stability and buffer optimization as an aid in protein crystallization. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 10, Unit10.28. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1028s94>
17. Rosa, N., Ristic, M., Seabrook, S. A., Lovell, D., Lucent, D., & Newman, J. (2015). MeltDown: A Tool to Help in the Interpretation of Thermal Melt Curves Acquired by Differential Scanning Fluorimetry. *Journal of biomolecular screening*, 20(7), 898–905. <https://doi.org/10.1177/1087057115584059>
18. Schulz, M. N., Landström, J., & Hubbard, R. E. (2013). MTSA--a Matlab program to fit thermal shift data. *Analytical biochemistry*, 433(1), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.020>
19. Wang, C. K., Weeratunga, S. K., Pacheco, C. M., & Hofmann, A. (2012). DMAN: a Java tool for analysis of multi-well differential scanning fluorimetry experiments. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(3), 439–440. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr664>
20. Gao, K., Oerlemans, R., & Groves, M. R. (2020). Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. *Biophysical reviews*, 12(1), 85–104. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00619-2>
21. Cesaratto F, Burrone OR, Petris G (2016). Tobacco Etch Virus protease: A shortcut across biotechnologies. *J. Biotechnol.* 231:239-249. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.06.012
22. Cabrera LD, Gilis D, Robertson AL, Dehouck Y, Rooman M, Bottomley SP (2007). Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design. *Protein Sci.* 16(11):2360-2367. doi:10.1110/ps.072822507
23. Bhayani, J. A., & Ballicora, M. A. (2022). Determination of dissociation constants of protein ligands by thermal shift assay. *Biochemical and biophysical research communications*, 590, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.12.041>
24. Kushwah, N., Jain, V., & Yadav, D. (2020). Osmolytes: A Possible Therapeutic Molecule for Ameliorating the Neurodegeneration Caused by Protein Misfolding and Aggregation. *Biomolecules*, 10(1), 132. <https://doi.org/10.3390/biom10010132>
25. Guo, X., Campbell, F. E., Sun, L., Christian, E. L., Anderson, V. E., & Harris, M. E. (2006). RNA-dependent folding and stabilization of C5 protein during assembly of the E. coli RNase P holoenzyme. *Journal of molecular biology*, 360(1), 190–203. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.001>
26. Henkels, C. H., Kurz, J. C., Fierke, C. A., & Oas, T. G. (2001). Linked folding and anion binding of the Bacillus subtilis ribonuclease P protein. *Biochemistry*, 40(9), 2777–2789. <https://doi.org/10.1021/bi002078y>



**BIOL. ELIZABETH NALLELY
CABRERA GONZÁLEZ
ORCID: 0000-0001-8766-6996**

Elizabeth Nallely Cabrera González es originaria de la Ciudad de México. Obtuvo el grado de bióloga por la UNAM.

A lo largo de más de 30 años ha estado adscrita al Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM en el grupo del Dr. Ruy Pérez Montfort. Desde 2009 cuenta con el máximo reconocimiento que otorga la UNAM siendo en la actualidad Técnico Académico Titular "C" definitivo de tiempo completo y en primas a la productividad cuenta con PRIDE nivel D. Fue reconocida por el Sistema Nacional de Investigadores Nivel 1 del 2009 al 2015.

La bióloga Cabrera González tiene amplia experiencia en técnicas de biología molecular, sobreexpresión y caracterización de proteínas, enzimología y técnicas biofísicas, algunas de ellas pioneras en México, por lo que es una persona de referencia y consulta sobre este tipo de estrategias y problemas para investigadores y alumnos del IFC, así como de otras dependencias como la Facultad de Medicina y la Facultad de Química de la UNAM, la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), la Universidad de la República de Uruguay y la Universidad Darcy Ribeiro en Brasil. Estas contribuciones, tanto por parte del laboratorio de adscripción como de manera independiente, han sido reconocidas con 47 publicaciones en revistas indexadas, fungiendo como autora o coautora. Estos trabajos han recibido más de 450 citas. Así mismo ha enseñado y entrenado a todos los estudiantes de su laboratorio de adscripción, así como a otros estudiantes e investigadores de otros laboratorios de la UNAM y de otras Universidades del país y del extranjero. Esta labor está reflejada en parte en las 45 tesis de licenciatura y posgrado en los que se agradece su asesoría técnica.

La entrega y pasión del trabajo de Nallely Cabrera han sido reconocidas a través del Estímulo Guillermo Massieu otorgado por la Coordinación de la Investigación científica de la UNAM y el reconocimiento Sor Juana Inés de la Cruz otorgado a las mujeres mexicanas que por su trayectoria han desarrollado funciones sustantivas en docencia, investigación o difusión de la cultura en la UNAM.