

1. Portada

Fecha de presentación del proyecto	16 de octubre de 2025
Sesión de Consejo de aprobación	
Clave del proyecto asignada por Consejo Divisional	

1.1 Título del proyecto

Estudio de propiedades termodinámicas de proteínas termófilas utilizando técnicas computacionales

1.2 Línea de investigación del Cuerpo Académico

- a) Físicoquímica Molecular
- b) Ingeniería y Diseño Molecular

1.3 Responsable del proyecto, participantes y adscripción

Responsable: Dr. Salomón de Jesús Alas Guardado

Adscripción: Departamento de Ciencias Naturales, UAM Cuajimalpa

Participante: Dr. Edgar López Pérez

Adscripción: Department of Molecular & Cell Biology, University of Connecticut, U.S.A.

1.4 Orientación

Investigación básica

1.5 Fecha de inicio y duración

Fecha de inicio: 01 de febrero de 2026

Duración: 4 años

2. Propuesta

2.1 Resumen

En la actualidad se cuenta con diferentes técnicas experimentales, como la calorimetría diferencial de barrido, que permiten obtener parámetros termodinámicos de proteínas, entre los cuales se encuentran los cambios de entalpía y capacidades caloríficas, por ejemplo. Estos parámetros son útiles para dar pistas acerca del proceso de desplegamiento y la estabilidad estructural de estas biomoléculas. Los hallazgos muestran que cada proteína posee una huella calorimétrica única, pero el problema radica en que hacer los experimentos calorimétricos tienen costos económicos elevados, principalmente porque las proteínas deben cumplir con altos grados de purificación y la adquisición de los equipos no son siempre accesibles para los investigadores, aunado al hecho de que al contar con los equipos sus mantenimientos siempre requieren recursos adicionales. Una alternativa viable para solventar estos obstáculos es la realización de experimentos *in silico*, pues se han desarrollado algunas metodologías que permiten predecir parámetros termodinámicos recurriendo a la capacidad computacional, en particular por medio de simulaciones de dinámica molecular (MD). En este proyecto se pretenden aplicar y desarrollar estrategias de MD para determinar y predecir algunas propiedades termodinámicas claves que están involucradas en la estabilidad estructural de proteínas. Además, a fin de enriquecer esta investigación, se utilizarán herramientas bioinformáticas para realizar alineamientos de secuencias, predicciones de estabilidad, modelado estructural, etc. Finalmente, para cumplir con las metas y objetivos de este proyecto se usarán como modelos de estudio diferentes proteínas procedentes de organismos mesófilos, termófilos e hipertermófilos.

2.2 Antecedentes

La estabilidad de proteínas se puede analizar por medio de diferentes técnicas experimentales como fluorescencia, dicroísmo circular (CD) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) [1]. Con la técnica DSC se pueden obtener diferentes parámetros termodinámicos de estas biomoléculas, por ejemplo, la temperatura media de desnaturalización (T_m), la temperatura de mayor estabilidad térmica (T_s), el cambio de entalpía medida en T_m ($\Delta H(T_m)$) y el cambio de la capacidad calorífica (ΔC_p). Estos parámetros son esenciales para construir curvas de estabilidad termodinámica, las cuales son útiles para seguir el proceso de desplegamiento de proteínas desde el estado nativo (N) al estado desnaturalizado (D) [1, 2].

Para construir dichas curvas se emplea la ecuación modificada de Gibbs-Helmholts:

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_m) \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) + \Delta C_p \left((T - T_m) - T \ln \frac{T}{T_m}\right) \quad (1)$$

La temperatura T_m es un parámetro esencial en el análisis termodinámico de proteínas, ya que en este punto el 50% de la proteína se encuentra en estado nativo y el otro 50% en el estado desnaturalizado [2]. Arriba de este valor la proteína pierde su funcionalidad.

La Figura 1 muestra las curvas de estabilidad termodinámica de dos proteínas homólogas de histidinas fosfotransportadoras HPr procedentes de las bacterias mesófila *Bacillus subtilis* (BsHPr) y termófila *Bacillus stearothermophilus* (BstHPr). Aquí se puede observar que la proteína termófila presenta mayor resistencia a la temperatura y se sabe que los puentes salinos contribuyen a este comportamiento [3, 4].

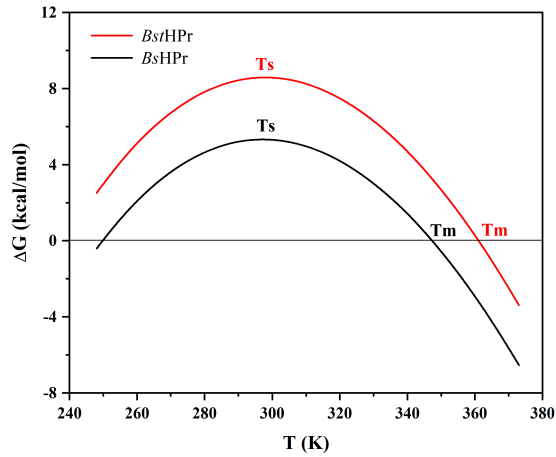


Figura 1. Curvas de estabilidad termodinámica de las proteínas BsHPPr y BsHPPr. Se indican los puntos de Ts y Tm para ambas proteínas. Observe que en Tm el valor de $\Delta G = 0$ kcal/mol.

Además, de conocer y analizar qué interacciones están involucradas en la estabilidad térmica de proteínas, es conveniente contar con estrategias que permitan analizar y predecir las propiedades termodinámicas que se utilizan en la construcción de las curvas de estabilidad sin recurrir a los experimentos *in vitro*, siendo la dinámica molecular una alternativa viable al respecto.

Una forma simple de abordar el proceso de desplegamiento de una proteína es mediante el análisis de la fracción de contactos nativos, el cual se refiere al cálculo de los contactos topológicos que existen entre los átomos de los residuos no contiguos de la proteína plegada. En este sentido, se analiza la trayectoria de cada átomo a través del paisaje energético durante el tiempo de simulación. Para calcular la Tm a partir de los datos de contactos nativos, se utiliza un modelo de ajuste sigmoideo basado en el modelo que describe la ecuación logística de Boltzmann para fenómenos de transición [5], es decir, esta ecuación es de utilidad para sistemas que presentan transición cooperativa. La ecuación empírica que modela este tipo de ajuste en función de la temperatura $f(T)$ es la siguiente:

$$f(T) = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(T-T_m)/k}} + A_2 \quad (2)$$

donde T es la temperatura de interés, k es la pendiente (relacionada con la cooperatividad de la transición), A_1 y A_2 son los valores inicial y final de la fracción de contactos nativos. El valor de Tm puede ser inferido como el punto medio de la transición de desplegamiento, en otras palabras, el punto de inflexión de la curva sigmoidea generada por los valores de los contactos nativos.

Además, del cálculo de Tm por MD, se puede determinar el ΔC_p , lo cual se realiza por medio del análisis del área superficial accesible al solvente (ASA). Este análisis permite medir indirectamente los contactos hidrófobos y el empaquetamiento del centro hidrófobo de la proteína. Esto se logra al determinar el número de átomos que se encuentran en contacto con el solvente. La medición se hace con el total de los contactos y se pueden dividir en contactos entre residuos polares (ASAp) y residuos no polares (ASAnp). Estas mediciones indican qué tanto se despliega la proteína por el efecto de la temperatura, exponiendo así zonas hidrófobas que normalmente están interaccionando entre sí (zona no polar). Una vez obtenidos los valores de ASA, tanto para residuos polares como para los no polares, se puede realizar el cálculo del ΔC_p , para lo cual se puede emplear la ecuación:

$$\Delta C_p = 2.14 \times \Delta AS_{Anp} - 0.88 \times \Delta AS_{Ap} \quad (3)$$

Esta ecuación fue propuesta por Makhatadze y Privalov [6] y se basa en el muestreo de diversas estructuras proteicas mediante una aproximación experimental del cálculo del ΔC_p con respecto al ΔAS_A , durante el paso del estado nativo al estado desnaturalizado. Además, esta ecuación no es única, pues se han propuesto otras alternativas para hacer esta medición [7].

Finalmente, se han implementado estrategias de MD para medir otras propiedades termodinámicas como ΔH de desplegamiento [8]. Entonces, al contar con estas herramientas que permiten determinar los parámetros T_m , ΔC_p y ΔH es posible construir y predecir curvas de estabilidad a partir de las simulaciones, con lo cual se puede describir la “huella calorimétrica” sin recurrir a experimentos del laboratorio “real”.

2.3 Objetivo General y objetivos particulares

Objetivo general

Calcular parámetros termodinámicos de proteínas procedentes de organismos mesófilos, termófilos e hipertermófilos utilizando simulaciones de dinámica molecular.

Objetivos específicos

- Seleccionar proteínas de interés fisicoquímico procedentes de organismos mesófilos, termófilos e hipertermófilos.
- Realizar simulaciones de dinámica molecular de las proteínas de interés con trayectorias de 1 a 5 μs .
- Obtener parámetros termodinámicos de las proteínas de interés.
- Construir curvas de estabilidad termodinámica de las proteínas a partir de los parámetros obtenidos de las simulaciones.

2.4 Descripción

Hipótesis

Es posible construir y predecir curvas de estabilidad térmica a partir de propiedades termodinámicas obtenidas por simulaciones de dinámica molecular.

Metodología

Los modelos proteicos que se tienen planeados simular son los siguientes:

Proteína	Organismo	Tipo	Tamaño (aa*)	PDB id
histidina fosfotransportadora (HPr)	<i>Bacillus subtilis</i>	mesófila	87	2HPR
	<i>Bacillus staerothermophilus</i>	termófila	88	1Y4Y
	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	termófila	88	3LNW
CheY	<i>Escherichia coli</i>	mesófila	120	3CHY
	<i>Thermotoga maritima</i>	hipertermófila	128	1TMY
metil guanina metil transferasa (MGMT)	<i>Escherichia coli</i>	mesófila	178	1SFE
	<i>Pyrococcus kodakaraensis</i>	hipertermófila	174	1MGT

*aa = aminoácidos

Las estructuras cristalográficas de rayos X se obtienen del banco de datos de proteínas (PDB) con los códigos mostrados en la tabla anterior. Estas estructuras se protonan utilizando el servidor PropKa [9] a pH neutro (pH = 7.0). Las simulaciones se realizan con el programa de libre acceso GROMACS versión 2024 o posteriores [10] utilizando el campo de fuerza AMBER99SB o CHARMM [11]. Para llevar a cabo tales simulaciones se usa el protocolo siguiente.

Cada proteína se debe colocar dentro de una caja, que en este caso tiene geometría dodecaédrica, con condiciones de contorno periódicas aplicadas en todas sus caras. Las moléculas del solvente se agregan de forma explícita por medio del modelo de agua SPCE [12] y la distancia entre el último átomo de la proteína y el borde de la caja debe estar en el intervalo de 1.0 a 2.0 nm. Además, se utiliza el algoritmo “genion” para añadir los contraiones adecuados de Na^+ y Cl^- que neutralizan la carga total del sistema a pH = 7.0.

Las interacciones electrostáticas de largo alcance se calculan mediante el método de las sumas de Ewald (PME), utilizando un corte de Coulomb de 1.0 nm y un espaciado de Fourier de 0.16 nm en una interpolación cúbica de cuarto orden, mientras que las interacciones de van der Waals se calculan utilizando un corte de 1.0 nm. La energía de los sistemas se minimiza utilizando el algoritmo de “descenso más rápido”. Este proceso debe converger cuando la fuerza máxima sea inferior a $1,000 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1}$ y la energía potencial debe ser negativa en un intervalo de 10^5 – $10^6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Después de la etapa de minimización de la energía, se necesitan equilibrar la temperatura y la presión del sistema.

El equilibrio de la temperatura se hace con una extensión del termostato de Berendsen conocido como método de “reescalamiento de velocidades” [13]. En este proyecto, los sistemas se van a equilibrar a temperaturas que estén en el intervalo desde el estado nativo hasta el estado desplegado, posiblemente entre 300 y 500 K. La presión se debe equilibrar a 1 bar mediante el baróstato de Parrinello-Rahman y un coeficiente de compresibilidad de $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ [14]. Los dos termostatos, el de temperatura o NVT y el de presión o NPT, se equilibran empleando tiempos de 100 a 300 ps. Finalmente, se utiliza el algoritmo LINCS para limitar y restringir las longitudes de los enlaces.

Una vez que se ha equilibrado el sistema, se procede a la etapa de producción. Durante esta etapa se pretenden simular 500 – 2,500 millones de pasos, con un paso de integración de 2 fs, lo que equivale a 1,000 – 5,000 ns, esto es, se pretenden hacer simulaciones de 1 a 5 μs , esto con el fin de hacer una mayor exploración conformacional, ya que se obtendrán de 10,000 a 50,000 configuraciones de cada sistema. Además, a fin de garantizar la reproducibilidad de los experimentos se realizan tres simulaciones independientes para cada temperatura, lo cual asegura de forma inequívoca una exploración más detallada de los estados conformacionales de la proteína.

Finalmente, después de realizar las simulaciones se procede a determinar las propiedades termodinámicas descritas en los antecedentes, principalmente T_m y ΔC_p , con las cuales se tiene cierta experiencia y se han generado protocolos de medición. Mientras otras propiedades, como el cálculo de ΔH , se incorporarán a medida que el proyecto avance, pues es necesario aprender e implementar los protocolos adecuados.

2.5 Formación de recursos humanos

- a) Formación de cuatro alumnos de licenciatura, puede ser que cursen el Proyecto Terminal o realicen investigación de Servicio Social.
- b) Formación de un alumno de maestría.

2.6 Productos esperados

- Publicación de un artículo de investigación por año en revistas que cuenten con arbitraje internacional.
- Asistencia y participación por lo menos a un congreso nacional por año.

2.7 Impacto esperado

Este proyecto tiene como meta principal robustecer el conocimiento acerca del comportamiento estructural y fisicoquímico de proteínas resistentes a la temperatura. El protocolo que se pretende desarrollar con proteínas modelo podrá ser aplicado a proteínas con valor agregado utilizadas a nivel industrial, en donde los procesos térmicos son esenciales para obtener materias intermedias y productos finales. Además, el conocimiento adquirido durante esta investigación será útil para presentarlo en los cursos a nivel licenciatura y posgrado, contribuyendo a la calidad educativa, ya que se tendrán un análisis reciente del cómo abordar las propiedades termodinámicas en proteínas desde una perspectiva computacional, evitando costos elevados en el laboratorio.

2.8 Recursos necesarios

- Financiamiento e infraestructura física y humana actual en el proyecto

• Financiamiento actual	
	Apoyo anual del Departamento de Ciencias Naturales (\$30,000).
• Infraestructura física actual	
	Un servidor de alto rendimiento con 1 unidad de procesamiento gráfico (GPU) NVIDIA GeForce RTX 2060 con 24 procesadores.
	Un servidor de alto rendimiento con 1 GPU NVIDIA GeForce RTX 2080 con 20 procesadores.
	Un servidor de alto rendimiento con 2 GPU NVIDIA GeForce RTX 2080 con 52 procesadores.
	2 GPU NVIDIA GeForce RTX 3080.
• Infraestructura humana actual	
	Dr. Salomón de Jesús Alas Guardado
	Dr. Edgar López Pérez

- Presupuesto calendarizado

Año	Rubro	Monto
1	• Adquisición de 3 GPU	\$45,000.00
	• Instalación de 2 GPU NVIDIA GeForce RTX 3080	\$15,000.00
	• Mantenimiento de equipos	\$25,000.00
	• Adquisición de 2 discos duros externos de 1 TB	\$5,000.00
	• Gastos de hospedaje y viáticos para asistencia a un congreso nacional	\$5,000.00
	• Gastos de pasajes para asistencia a un congreso nacional	\$5,000.00
2	• Mantenimiento de equipos	\$25,000.00
	• Adquisición de 2 discos duros externos de 1 TB	\$5,000.00
	• Gastos de hospedaje y viáticos para asistencia a un congreso nacional	\$5,000.00
	• Gastos de pasajes para asistencia a un congreso nacional	\$5,000.00

3	• Mantenimiento de equipos	\$25,000.00
	• Adquisición de 2 discos duros externos de 1 TB	\$5,000.00
	• Gastos de hospedaje y viáticos para asistencia a un congreso nacional	\$5,000.00
	• Gastos de pasajes para asistencia a un congreso nacional	\$5,000.00
4	• Mantenimiento de equipos	\$25,000.00
	• Adquisición de 2 discos duros externos de 1 TB	\$5,000.00
	• Gastos de hospedaje y viáticos para asistencia a un congreso nacional	\$5,000.00
	• Gastos de pasajes para asistencia a un congreso nacional	\$5,000.00
Total		\$220,000.00

c) Fuentes de financiamiento externas.

Aún no se cuentan con fuentes de financiamiento externas. Se pretende someter el proyecto a instancias externas para solicitar recursos que ayuden al desarrollo del mismo.

3. Calendario de actividades en períodos trimestrales

[illegible]

4. Información para el seguimiento del proyecto

4.1 Calendarización de productos esperados a lo largo del proyecto

Producto	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4
Formación de recursos humanos nivel licenciatura				
Servicio Social				
Proyecto terminal	1	1	1	1
Tesis de licenciatura				
Formación de recursos humanos posgrado				
Especialización				
Maestría			1	
Doctorado				
Publicaciones				
Artículos	1	1	1	1
Capítulos de libro				
Memorias o Proceedings				
Difusión o Divulgación				
Congresos	1	1	1	1
Conferencias				
Otros				

4.2 Resultados esperados

- Formación de cuatro alumnos de licenciatura y un alumno de maestría.
- Publicación de un artículo de investigación por año en revistas que cuenten con arbitraje internacional.
- Asistencia y participación por lo menos a un congreso nacional por año.
- Contribución a mantener consolidado el Laboratorio de Fisicoquímica y Simulación Molecular.
- Enriquecimiento de la línea de investigación “estudio de estabilidad en proteínas”.
- Enriquecimiento de la línea de investigación “estudio del proceso de plegamiento/desplegamiento en proteínas”.

Referencias

- [1] Robertson, A.D.; Murphy, K.P. (1997). Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chem. Rev.* **97**, 1251–1267.
- [2] Razvi, A.; Scholtz, J.M. (2006) Lessons in Stability from Thermophilic Proteins. *Protein Sci.* **15**, 1569–1578.
- [3] Gómez-Flores, A.K.; López-Pérez, E.; Alas-Guardado, S.J. (2023). Molecular Dynamics Simulations of HPr Proteins from a Thermophilic and a Mesophilic Organism: A Comparative Thermal Study. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 9557.
- [4] Martínez-Zacarias, A.C.; López-Pérez, E.; Alas-Guardado, S.J. (2024). Effect of the Lys62Ala Mutation on the Thermal Stability of BstHPr Protein by Molecular Dynamics. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 6316.
- [5] Huynh, K.; Partch, C.L. (2015). Analysis of Protein Stability and Ligand Interactions by Thermal Shift Assay. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **79**, 28.9.1–28.9.14.
- [6] Loladze, V. V.; Ermolenko, D. N.; Makhatadze, G. I. (2001). Heat Capacity Changes Upon Burial of Polar and Nonpolar Groups in Proteins. *Protein Sci.* **10**, 1343–1352.
- [7] López-Pérez, E.; Tuena de Gómez-Puyou, M.; José Nuñez, C.; Martínez Zapién, D.; Alas Guardado, S.; Beltrán, H.I.; Pérez-Hernández, G. (2023). Ordered-domain Unfolding of Thermophilic Isolated β Subunit ATP Synthase. *Prot. Sci.* **32** (7), e4689.
- [8] Galano-Frutos, J. J. Nerín-Fonz, F.; Sancho, J. (2023). Calculation of Protein Folding Thermodynamics Using Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Inf. Model.* **63** (24), 7791-7806.
- [9] Dolinsky, T.J.; Nielsen, J.E.; McCammon, J.A.; Baker, N.A. (2004). PDB2PQR: An Automated Pipeline for the Setup of Poisson–Boltzmann Electrostatics Calculations. *Nucleic Acids Res.* **32**, W665–W667.
- [10] Abraham, M.J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J.C.; Hess, B.; Lindahl, E. (2015). GROMACS: High Performance Molecular Simulations Through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX*, **1–2**, 19–25.
- [11] Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. (2006). Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **65**, 712–725
- [12] Berendsen, H.J.C.; Grigera, J.R.; Straatsma, T.P. (1987) The Missing Term in Effective Pair Potentials. *J. Phys. Chem.* **91**, 6269–6271
- [13] Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. (2007) Canonical Sampling through Velocity Rescaling. *J. Chem. Phys.* **126**, 014101.
- [14] Parrinello, M.; Rahman, A. (1981). Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *J. Appl. Phys.* **52**, 7182–7190.