



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Estudio computacional de la interacción de derivados de  
la orizalina con la  $\alpha$ -tubulina de protozoarios parásitos**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**Carlos Daniel Flores León**



**Ciudad Universitaria, CD. MX.**

**Año 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	Laura Domínguez Dueñas
<b>VOCAL:</b>	María Eugenia Mendoza Jasso
<b>SECRETARIO:</b>	Rodrigo Aguayo Ortiz
<b>1er. SUPLENTE:</b>	José Cordero Hernández
<b>2° SUPLENTE:</b>	Tania Campos González

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 111, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

**ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz

---

**SUSTENTANTE:**

Carlos Daniel Flores León

---

***Para mi madre y mi padre,  
son lo mejor de mi vida***

## **Agradecimientos**

Le agradezco profundamente a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la mejor educación en mi preparación como Químico Farmacéutico Biólogo.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IA-201022. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

A mi madre, Ana Gloria. Soy lo que soy por tus enseñanzas. Gracias por confiar en mi y darme todo incondicionalmente. Contigo he aprendido que el amor de madre no tiene fin.

A mi padre, Francisco. Gracias por los hermosos momentos juntos y por estar siempre conmigo sin ninguna recompensa.

A mi tutor de tesis, al Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz, por los conocimientos que me compartió en todo mi proyecto de investigación. Todas las horas de trabajo mutuo se ven reflejadas en esta tesis.

A mi Comité Tutor, por todas sus observaciones y recomendaciones realizadas para mejorar la calidad de esta tesis.

A mis amigos, Eduardo, Antonio, Ricardo, Xuxek y Fernanda. Gracias por tantas vivencias juntos. Ustedes hicieron de mi vida académica un recuerdo inolvidable.

A Alejandra, por todo el tiempo de calidad, aventuras, experiencias y convivencias que vivimos, significas mucho en mi vida.

A mis compañeros de laboratorio L-111, por los momentos tan divertidos que vivimos juntos.

---

**ÍNDICE GENERAL**

<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b> .....	<b>i</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>2</b>
II.1. Dinitroanilinas como agentes herbicidas y antiprotozoarios .....	2
II.2. Protozoarios parásitos .....	5
II.2.1. Protozoarios susceptibles a tratamiento con orizalina .....	5
II.2.2. Protozoarios no susceptibles.....	9
II.2.3. Otros organismos no susceptibles .....	11
II.3. La tubulina como blanco terapéutico de derivados de dinitroanilina.....	11
II.3.1. Mutaciones en la $\alpha$ -tubulina.....	12
II.3.2. Propuestas del sitio de unión .....	13
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>15</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>VI. METODOLOGÍA</b> .....	<b>16</b>
VI.1. Preparación de ligandos .....	16
VI.1.1. Predicción del $pK_a$ .....	16
VI.1.2. Construcción de los ligandos .....	16
VI.1.4. Parametrización para el campo de fuerza AMBER.....	17
VI.2. Preparación de proteínas .....	17
VI.2.1. Alineamiento de secuencias .....	17
VI.2.2. Modelado por homología .....	17
VI.3. Acoplamiento molecular .....	18
VI.4. Dinámica molecular .....	18
VI.4.1. Simulaciones convencionales.....	18
VI.4.2. Dinámica molecular acelerada.....	19
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>21</b>
VII.1. Perfil de interacción de ORY y sus derivados con TgAT .....	21
VII.1.1. Caracterización dinámica de ORY en TgAT .....	23
VII.1.2. Caracterización dinámica de derivados de ORY en TgAT.....	25
VII.2. Unión de ORY a la $\alpha$ -tubulina de organismos susceptibles y no susceptibles ...	28
VII.2.1. Comparación entres sitios de unión.....	28
VII.2.2. Modo de unión de ORY en los diferentes modelos de $\alpha$ -tubulina.....	29
VII.3. Tiempo de residencia de ORY en TgAT y HsAT .....	34
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>37</b>
<b>X. REFERENCIAS</b> .....	<b>38</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>45</b>

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA	aminoácido
Aa	<i>Alopecurus aequalis</i>
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CI50	Concentración inhibitoria 50
CLN	Cloralina
Cr	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
$d_{CG}$	Distancia entre centros geométricos
DNT	Dinitroanilina
E.L.	Eficiencia del ligando
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FO	Factor de ocupación
GAFF	<i>Generalized AMBER force field</i>
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
Gi	<i>Giardia intestinalis</i>
GiAT	$\alpha$ -tubulina de <i>Giardia intestinalis</i>
HB	Puentes de hidrógeno
HI	Interacciones hidrofóbicas
Hs	<i>Homo sapiens</i>
HsAT	$\alpha$ -tubulina de <i>Homo sapiens</i>
Lm	<i>Leishmania mexicana</i>
LmAT	$\alpha$ -tubulina de <i>Leishmania mexicana</i>
Lr	<i>Lolium rigidum</i>
MM/PBSA	<i>Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area</i>
NPT	Ensamble isotérmico-isobárico
NVT	Ensamble canónico
ORY	Orizalina
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfAT	$\alpha$ -tubulina de <i>Plasmodium falciparum</i>
RMSD	Desviación de la raíz cuadrática media
RMSF	Fluctuación de la raíz cuadrática media
Sv	<i>Setaria viridis</i>
Tbb	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
TFL	Trifluralina
Tg	<i>Toxoplasma gondii</i>
TgAT	$\alpha$ -tubulina de <i>Toxoplasma gondii</i>
$\tau$ RAMD	<i>tau-Random Acceleration Molecular Dynamics</i>
WB	Puentes de agua

### I. INTRODUCCIÓN

Los microtúbulos son estructuras poliméricas constituidas principalmente por heterodímeros de  $\alpha/\beta$  tubulina.<sup>1</sup> Estas estructuras son esenciales para el mantenimiento, comunicación, transporte y división celular. Actualmente, se conoce una gran variedad de fármacos y moléculas bioactivas que intervienen en el equilibrio dinámico de polimerización-despolimerización de los heterodímeros tubulina, ya sea desencadenando la catástrofe mitótica celular (agentes inhibidores de la polimerización) o promoviendo el alargamiento de los microtúbulos (agentes estabilizadores de la polimerización). Estos mecanismos de acción han permitido utilizar a este grupo de moléculas en el tratamiento de diferentes padecimientos, tales como parasitosis, cáncer, entre otros.

A pesar de los grandes avances en la determinación cristalográfica de complejos tubulina-ligando, existe una gran variedad de agentes inhibidores de la polimerización de los cuales aún se desconoce su sitio de unión. Entre estos inhibidores, se encuentran compuestos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) para ser empleados como antiparasitarios, antifúngicos y herbicidas.<sup>2</sup> La orizalina (ORY) es un agente herbicida de acción preemergente que inhibe la polimerización de los microtúbulos de parásitos protozoarios como *Leishmania mexicana* (leishmaniasis), *Toxoplasma gondii* (toxoplasmosis) y *Plasmodium falciparum* (malaria).<sup>3</sup> Este derivado de la dinitroanilina inhibe el proceso de polimerización de los microtúbulos como resultado de su interacción con la  $\alpha$ -tubulina. Además, se ha comprobado que ORY no modifica el equilibrio dinámico de polimerización en mamíferos.<sup>4</sup> Por esto último, la determinación del sitio y modo de unión de ORY y sus derivados en la  $\alpha$ -tubulina de protozoarios parásitos aportaría información relevante para el diseño de nuevos fármacos antiparasitarios con baja toxicidad.

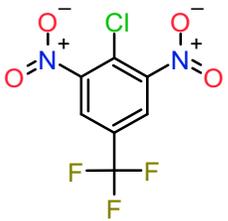
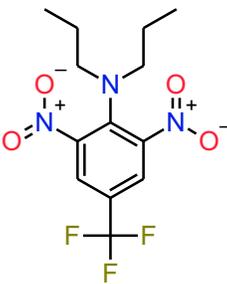
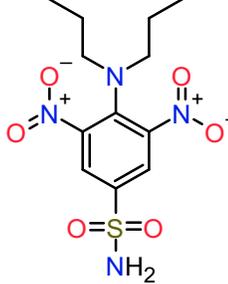
En este trabajo, se recolectaron derivados de ORY con actividad antiprotozoaria y se estudió su perfil de interacción en modelos tridimensionales de  $\alpha$ -tubulina de organismos susceptibles y no susceptibles. Adicionalmente, se realizaron simulaciones de dinámica molecular de los complejos  $\alpha$ -tubulina-ligando para determinar la estabilidad, así como también se calculó el tiempo de residencia entre organismos susceptibles y no susceptibles. Los resultados de este trabajo serán de gran importancia para el diseño de nuevos compuestos inhibidores de la polimerización de la tubulina con potencial actividad antiprotozoaria.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Dinitroanilinas como agentes herbicidas y antiprotozoarios

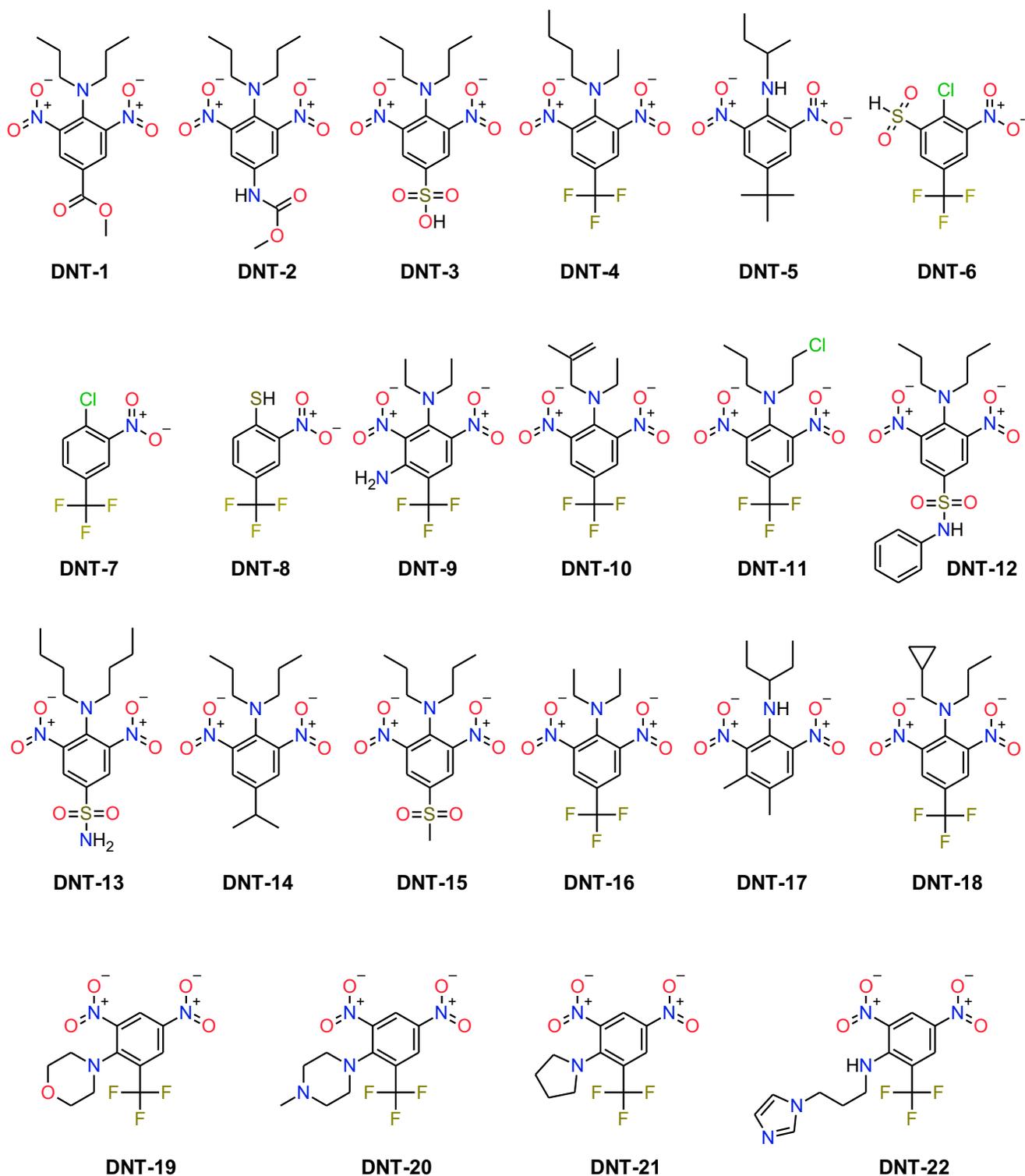
Los derivados de la dinitroanilina son compuestos comúnmente utilizados para el control de maleza en diferentes plantíos, dentro de los que se encuentran la cloralina (CLN), la trifluralina (TFL) y la orizalina (ORY) (ver *Figura 2.1*). Tanto CLN como TFL se emplean para el control de maleza en plantíos de algodón y cultivos vegetales, mientras que ORY es utilizada para el control preemergente de maleza<sup>5</sup> como *Arabidopsis thaliana*,<sup>6</sup> *Alopecurus aequalis*,<sup>7</sup> *Lolium rigidum*<sup>8</sup> y *Setaria viridis*.<sup>9</sup> Es importante mencionar que CLN es comúnmente un precursor contaminante en la TFL comercial, cuyo inconveniente es la alta reactividad y toxicidad.<sup>10</sup>

Estudios previos han demostrado que estos agentes herbicidas también presentan actividad antiparasitaria contra protozoarios, tales como *Toxoplasma gondii*,<sup>11</sup> *Plasmodium falciparum*,<sup>12</sup> *Leishmania mexicana*,<sup>10,13-15</sup> *Leishmania donovani*,<sup>14</sup> *Trypanosoma cruzi*,<sup>13,16</sup> *Trypanosoma brucei*,<sup>16</sup> *Giardia intestinalis*<sup>17</sup> y *Entamoeba histolytica* (*Figura 2.1*).<sup>18</sup> Además, estos estudios encontraron que los derivados de dinitroanilina no afectan a los vertebrados u organismos del reino fungi.<sup>19</sup>

CLN		TFL		ORY	
					
Organismo	Cl <sub>50</sub> (μM)	Organismo	Cl <sub>50</sub> (μM)	Organismo	Cl <sub>50</sub> (μM)
<i>L. mexicana</i> <sup>10</sup>	0.9 ± 0.3	<i>T. gondii</i> <sup>11</sup>	0.5 ± 0.1	<i>T. gondii</i> <sup>11</sup>	0.25 ± 0.02
<i>L. major</i> <sup>16</sup>	0.9 ± 0.3	<i>L. major</i> <sup>16</sup>	4.0 ± 0.0	<i>L. mexicana</i> <sup>17</sup>	17.3 ± 0.0
<i>T. cruzi</i> <sup>16</sup>	9.5 ± 2.7	<i>L. tropica</i> <sup>16</sup>	6.0 ± 0.0	<i>L. donovani</i> <sup>14</sup>	44.1 ± 9.2
		<i>L. donovani</i> <sup>16</sup>	3.0 ± 0.0	<i>P. falciparum</i> <sup>21</sup>	3.9 ± 0.4
		<i>P. falciparum</i> <sup>12</sup>	2.9 ± 0.0	<i>G. intestinalis</i> <sup>17</sup>	> 50.0 ± 0.0
		<i>T. brucei</i> <sup>16</sup>	7.0 ± 0.0	<i>T. brucei</i> <sup>13</sup>	11.0 ± 0.0
		<i>C. elegans</i> <sup>20</sup>	57.0 ± 0.0	<i>T. cruzi</i> <sup>22</sup>	250.5 ± 0.0
				<i>C. elegans</i> <sup>20</sup>	30.0 ± 0.0

**Figura 2.1.** Estructura química y concentración inhibitoria 50 (Cl<sub>50</sub>) contra protozoarios parásitos y el nematodo modelo *Caenorhabditis elegans* de cloralina (CLN), trifluralina (TFL) y orizalina (ORY).

Debido a los prometedores resultados de actividad antiprotozoaria con estos compuestos, se han dirigido investigaciones hacia la obtención de nuevos derivados y análogos de la dinitroanilina (*Figura 2.2*).



**Figura 2.2.** Estructura química de análogos de la dinitroanilina.

En la *Tabla 2.1*, se enlistan los análogos de la dinitroanilina más relevantes, la clave utilizada en el presente trabajo, el nombre asignado en la literatura, la actividad biológica y el parásito al cual pertenece dicha información. Dos de los compuestos de mayor interés en la actualidad son GB-II-5 (DNT-12) y GB-II-46 (DNT-13), puesto que estos derivaron del proceso extensión de estructura y homologación de ORY, respectivamente.

**Tabla 2.1.** Clave interna, nombre y actividad biológica de los análogos de la dinitroanilina

Clave	Nombre	Actividad biológica $CI_{50}$ ( $\mu$ M)	Parásito
DNT-1	IAU1 <sup>23</sup>	S.D.	-
DNT-2	IAU2 <sup>23</sup>	S.D.	-
DNT-3	IAU3 <sup>23</sup>	S.D.	-
DNT-4	Benfluralina <sup>5,11</sup>	1.5 $\pm$ 0.1	Tg
DNT-5	Butralina <sup>5,11</sup>	1.8 $\pm$ 0.2	Tg
DNT-6	CLN Análogo 1 <sup>10</sup>	6.1 $\pm$ 1.4	Lm
DNT-7	CLN Análogo 2 <sup>10</sup>	35 $\pm$ 9	Lm
DNT-8	CLN Análogo 3 <sup>10</sup>	15 $\pm$ 3	Lm
DNT-9	Dinitramina <sup>5,11</sup>	0.045 $\pm$ 0.008	Tg
DNT-10	Etalfluralina <sup>5,11</sup>	0.26 $\pm$ 0.01	Tg
DNT-11	Flucloralina <sup>5,11</sup>	0.33 $\pm$ 0.09	Tg
DNT-12	GB-II-5 <sup>11</sup>	6.7 $\pm$ 0.7	Tg
DNT-13	GB-II-46 <sup>13</sup>	2.6 $\pm$ 0.3	Tbb
DNT-14	Isopropalina <sup>5,11</sup>	0.88 $\pm$ 0.08	Tg
DNT-15	Nitralina <sup>5,11</sup>	0.50 $\pm$ 0.02	Tg
DNT-16	Nitrofor <sup>5</sup>	S.D.	-
DNT-17	Pendimetalina <sup>4,11</sup>	0.26 $\pm$ 0.03	Tg
DNT-18	Profluralina <sup>5,11</sup>	0.61 $\pm$ 0.10	Tg
DNT-19	TFL Análogo 1 <sup>24</sup>	S.D.	-
DNT-20	TFL Análogo 2 <sup>24</sup>	S.D.	-
DNT-21	TFL Análogo 3 <sup>24</sup>	S.D.	-
DNT-22	TFL Análogo 4 <sup>24</sup>	S.D.	-

S.D. = Sin Determinar

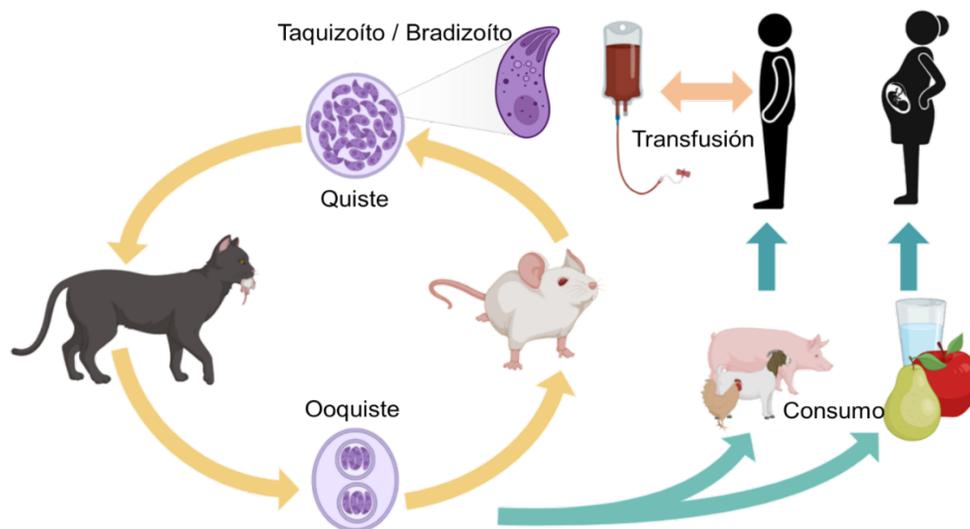
## II.2. Protozoarios parásitos

### II.2.1. Protozoarios susceptibles a tratamiento con orizalina

#### II.2.1.1. *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* es el parásito intracelular obligado causante de la toxoplasmosis. En México, hay una alta prevalencia de la enfermedad en los estados de Yucatán, Tabasco y Jalisco.<sup>25</sup> Los pacientes infectados presentan pocos síntomas debido al control por la respuesta inmune. Sin embargo, la forma severa de la enfermedad causa daño en cerebro y otros órganos vitales.<sup>26</sup> El ciclo de vida del parásito inicia con la reproducción sexual en los felinos, los cuales lo adquieren al consumir animales infectados con quistes del parásito en tejido (taquizoítos y bradizoítos) (Figura 2.3). Los residuos fecales de los gatos infectados liberan a las células denominadas ooquistes, las cuales pueden infectar a una gran diversidad de animales o contaminar alimentos.<sup>13</sup> El consumo de animales o alimentos por huéspedes intermediarios (ej. el humano) permite la reproducción asexual del parásito. Adicionalmente, el protozoario puede infectar al hospedero por medio de transfusiones sanguíneas contaminadas o por vía transplacentaria de madre al feto. La patogenicidad de *T. gondii* se debe a que el parásito penetra en los macrófagos de diversos tejidos, provocando su ruptura y necrosis. Además, induce la activación de la respuesta inmune y enquistamiento en tejidos infectados.<sup>12</sup>

La actividad antiprotozoaria de derivados de dinitroanilina en el estadio de taquizoíto mostró que el parásito es más susceptible a ORY que TFL, el primero presentando una  $CI_{50}$  de  $0.25 \pm 0.02 \mu\text{M}$  y el segundo una potencia de  $0.52 \pm 0.06 \mu\text{M}$ .<sup>11</sup>



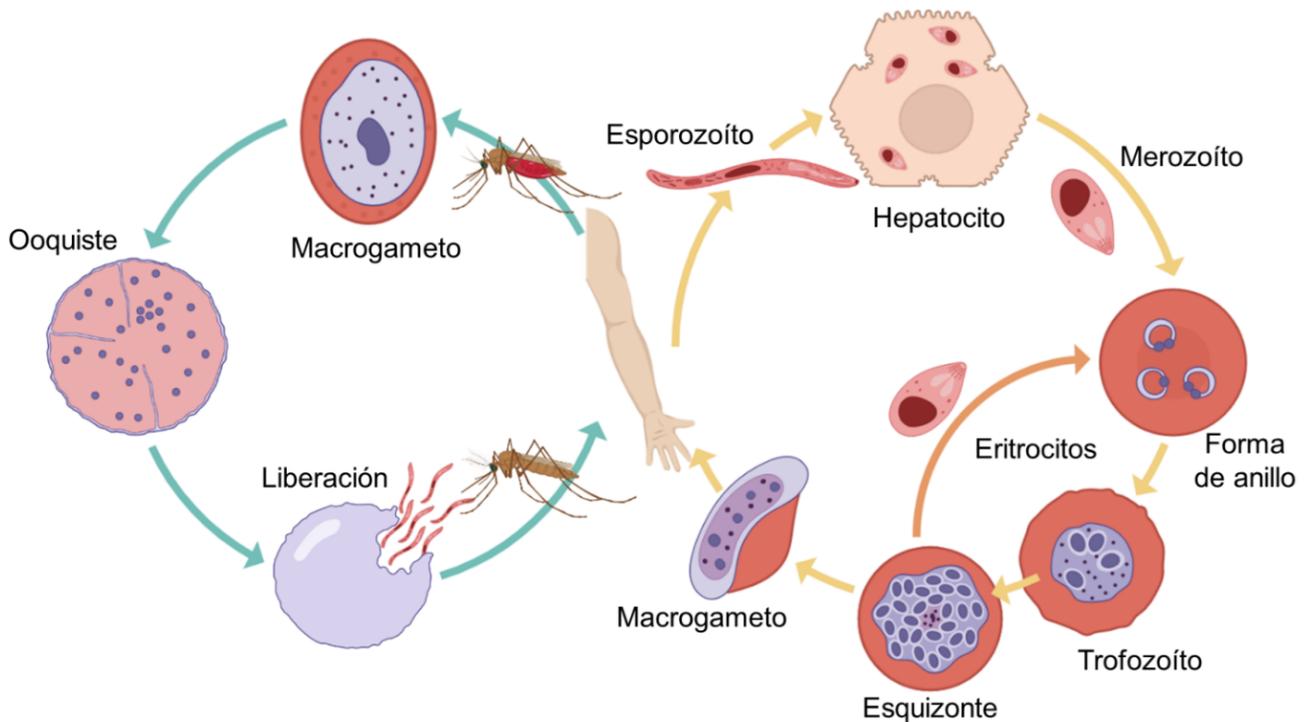
**Figura 2.3.** Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. El ciclo en color amarillo muestra la vía de reproducción sexual del protozoario y el ciclo de color azul la vía de la reproducción asexual.

**II.2.1.2. Plasmodium falciparum**

Este parásito es el agente causal de la enfermedad del paludismo, también conocida como malaria. Actualmente, la malaria es considerada una importante causa de muerte a nivel mundial, localizándose principalmente en climas tropicales cerca de cuerpos de agua.

La presencia de los cuerpos de agua le permite al parásito migrar a su vector, el mosquito *Anopheles* spp., en su morfología de esporozoíto (Figura 2.4). Posteriormente, el mosquito inocula al parásito en el humano a través de su picadura, lo que conlleva a su internalización en los hepatocitos. El parásito se multiplica y lisa a los hepatocitos para trasladarse a torrente sanguíneo e infectar a los eritrocitos en su estadio de merozoíto. Finalmente, la hembra de *Anopheles* spp. retira por picadura a los protozoarios, los cuales maduran dentro de este vector y permiten el reinicio del ciclo biológico del insecto. Los hospederos infectados sufren paludismo, la cual es una enfermedad sistémica con un amplio intervalo de síntomas, que van desde fiebre y escalofríos hasta la muerte.<sup>21,28,29</sup>

Se ha evaluado a derivados de dinitroanilina con *P. falciparum* en su morfología de trofozoíto y esquizonte, obteniéndose como resultado valores de  $CI_{50}$  de  $3.9 \mu M$  con ORY<sup>21</sup> y  $2.9 \mu M$  con TFL.<sup>12</sup>



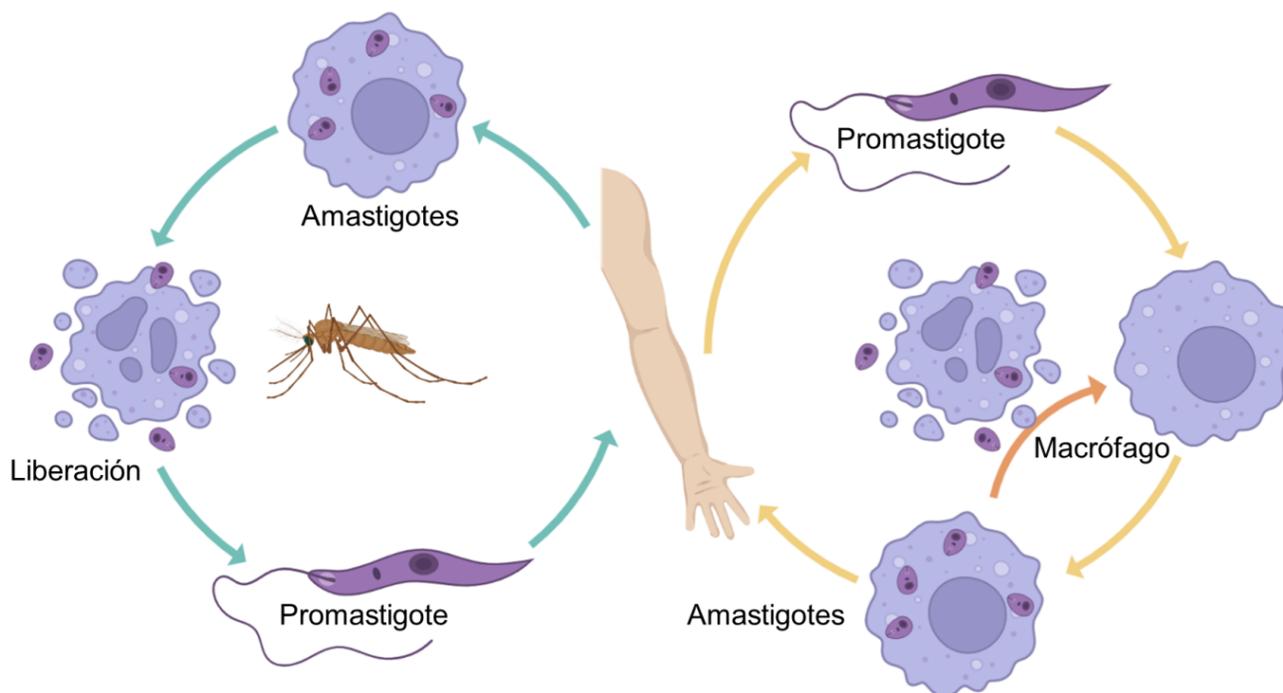
**Figura 2.4.** Ciclo biológico de *Plasmodium falciparum*. Se muestran en azul el ciclo sexual del parásito en *Anopheles* spp. y en amarillo la vía de reproducción asexual del parásito en el humano.

**II.2.1.3. *Leishmania mexicana***

*L. mexicana* es un parásito intracelular causante de la leishmaniosis cutánea comúnmente encontrado en regiones tropicales o subtropicales. En nuestro país, se localiza en mayor proporción en los estados de Tabasco, Quintana Roo y Nayarit.<sup>30</sup>

El organismo reservorio principal de este parásito son los roedores selváticos, mientras que el vector transmisor son los mosquitos hembra de *Lutzomyia* spp. (Figura 2.5). La picadura de este insecto ocasiona lesiones en la piel y el desarrollo de úlceras en la región de la picadura. Al momento de introducirse el parásito por picadura, este último se moviliza a las células de la piel y mucosa en su forma de promastigote. Posteriormente, el parásito evoluciona a amastigote dentro de los macrófagos y se multiplica rompiendo la célula e invadiendo a otras. Finalmente, otro mosquito retira las células infectadas, los amastigotes maduran a promastigotes dentro de él y pica a un nuevo individuo para completar el ciclo.<sup>14,28,31</sup>

En ensayos biológicos, ORY mostró una actividad aceptable contra *L. mexicana* en su morfología de promastigote ( $CI_{50} = 17.3 \mu M$ ).<sup>17</sup> Sin embargo, se ha reportado una menor potencia de este derivado de dinitroanilina en otras cepas de este parásito (ej. *L. donovani*,  $CI_{50} = 44.1 \pm 9.2 \mu M$ ).<sup>14</sup>



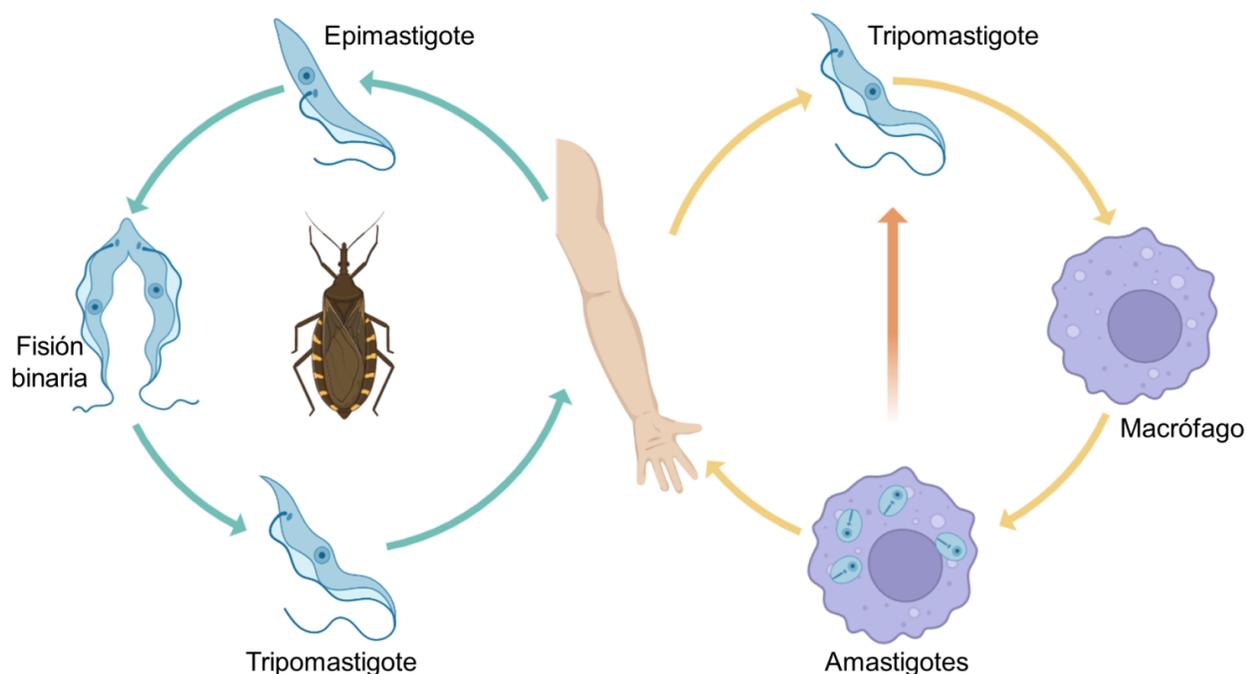
**Figura 2.5.** Ciclo biológico de *Leishmania mexicana*. Se muestran en azul el ciclo de maduración de promastigotes en *Lutzomyia* spp. y en amarillo el ciclo que ocurre dentro del hospedero.

**II.2.1.4. *Trypanosoma cruzi***

Este parasito intracelular se localiza en regiones tropicales, siendo el agente causal de la tripanosomiasis o enfermedad de Chagas.<sup>28</sup>

El protozooario es transmitido en su forma de tripomastigote al humano por el insecto *Triatoma* spp. (Figura 2.6). Los tripomastigotes absorbidos se transforman en el tubo digestivo del invertebrado a epimastigotes, donde se multiplican por fisión binaria y se desarrollan de nuevo como tripomastigotes. Este último estadio del protozooario es depositado en el excremento del insecto, el cual suele ser autoinoculado de forma inconsciente por el hospedero al frotar la piel e introducir el excremento al sitio de la picadura. La inoculación produce nódulos en el sitio de infección, además de generar daño directo por invasión a las células e inducir a la muerte celular. La células fagocíticas son esenciales para el ciclo biológico de este parásito, pues es en donde éste se multiplica como amastigote y disemina a otros tejidos en su forma de tripomastigote.<sup>28,32</sup>

Estudios recientes de actividad biológica con el estadio de epimastigote de *T. cruzi* mostraron valores de  $CI_{50}$  de 250.5  $\mu$ M.<sup>22</sup> En el caso de *T. brucei* con la morfología de tripomastigote, se reportaron valores de 11.0  $\mu$ M con ORY y > 6.0  $\mu$ M con TFL.<sup>13,16</sup>



**Figura 2.6.** Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. Se muestra en azul el ciclo dentro de *Triatoma* spp. y en amarillo el ciclo de vida en el humano.

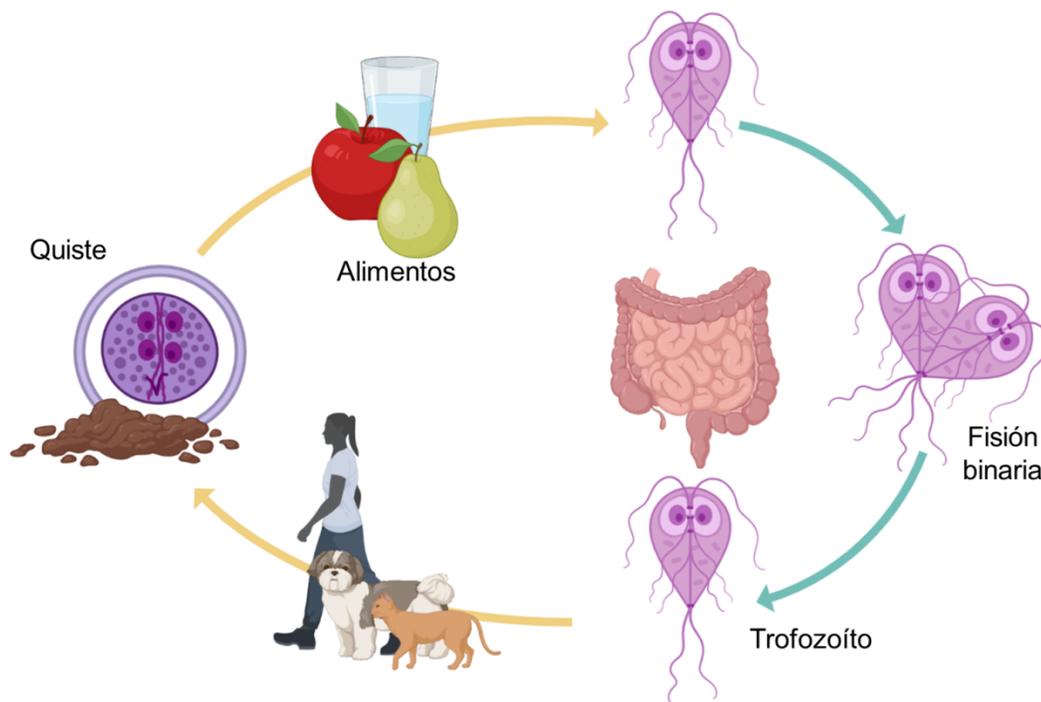
**II.2.2. Protozoarios no susceptibles**

**II.2.2.1. Giardia intestinalis**

También conocida como *Giardia lamblia*, es un protozoario cuya infección, la giardiasis, causa diarrea y dolor abdominal de manera crónica. Está presente a lo largo del mundo, especialmente en países en vías de desarrollo. En México los estados donde se presenta una mayor prevalencia son Veracruz, Chiapas y Oaxaca.<sup>30,33</sup>

Una vez que un hospedero es infectado con *G. intestinalis*, el parásito vive en los intestinos y se transmite por materia fecal en su morfología de quistes (*Figura 2.7*). En el duodeno, el quiste libera a su forma de trofozoíto hasta ser de nuevo expulsado por las heces como quiste. Fuera del huésped, puede vivir en el medio ambiente por varias semanas hasta infectar de nuevo a un animal a través de alimentos o agua contaminada.<sup>17,28</sup>

Se ha probado la susceptibilidad de trofozoítos de *G. intestinalis* al tratamiento con ORY, evaluándose el crecimiento celular a concentraciones de 1, 5, 10, 50 y 75  $\mu\text{M}$ .<sup>17</sup> El estudio mostró un crecimiento significativo del parásito en las diferentes concentraciones y a diferentes tiempos. El alto valor de  $\text{CI}_{50}$  ( $> 50 \mu\text{M}$ ) confirmó la falta de susceptibilidad de este protozoario a esta dinitroanilina.



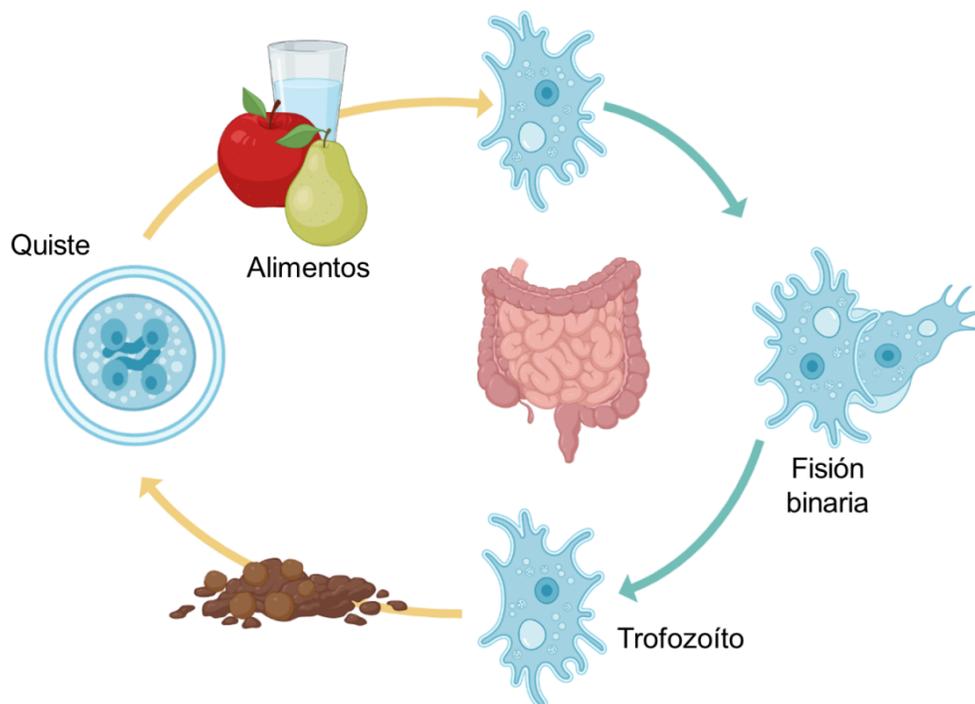
**Figura 2.7.** Ciclo biológico de *Giardia intestinalis*. Se muestra en azul la parte de su ciclo biológico que ocurre dentro del humano y en amarillo al ciclo biológico en el medio ambiente.

**II.2.2.2. *Entamoeba histolytica***

Es el agente causal de la amebiasis, infección que ocasiona diarrea aguda, colitis, dolor abdominal, fiebre y vómito en pacientes infectados.<sup>34</sup> Esta enfermedad se extiende mundialmente, pero afecta especialmente a los países en vías de desarrollo. En México, los estados con mayor número de casos son Chihuahua, Oaxaca, Veracruz y Puebla.<sup>30</sup>

Este protozoo tiene dos morfologías, una no infectante con aspecto ameboide y otra infectante en forma de quiste (*Figura 2.8*). Se transmite por materia fecal, contaminando agua y alimentos en su estadio de quiste. El hospedero se infecta al consumir los alimentos contaminados. En el intestino delgado, pasa a su forma ameboide propiciando los síntomas antes mencionados. En el intestino grueso, si se dan condiciones favorables, puede penetrar en la mucosa intestinal y provocar úlceras. La infección puede conllevar lesiones en otros tejidos al pasar a circulación sanguínea.<sup>18,28</sup>

Estudios realizados con los trofozoítos de la cepa HM-1:IMSS de *E. histolytica* mostraron que ORY no inhibe el crecimiento del protozoo a bajas concentraciones (7 y 10  $\mu\text{M}$ ). Porcentajes de inhibición mayores al 80 % se registraron con concentraciones de ORY superiores a los 30  $\mu\text{M}$ . De forma similar, con TFL se reportó que con 100  $\mu\text{M}$  el porcentaje de inhibición fue de tan solo un 20%.<sup>18</sup>



**Figura 2.8.** Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*. Se muestra en azul la parte de su ciclo biológico asociado a la infección del humano y en amarillo su desarrollo en el medio ambiente.

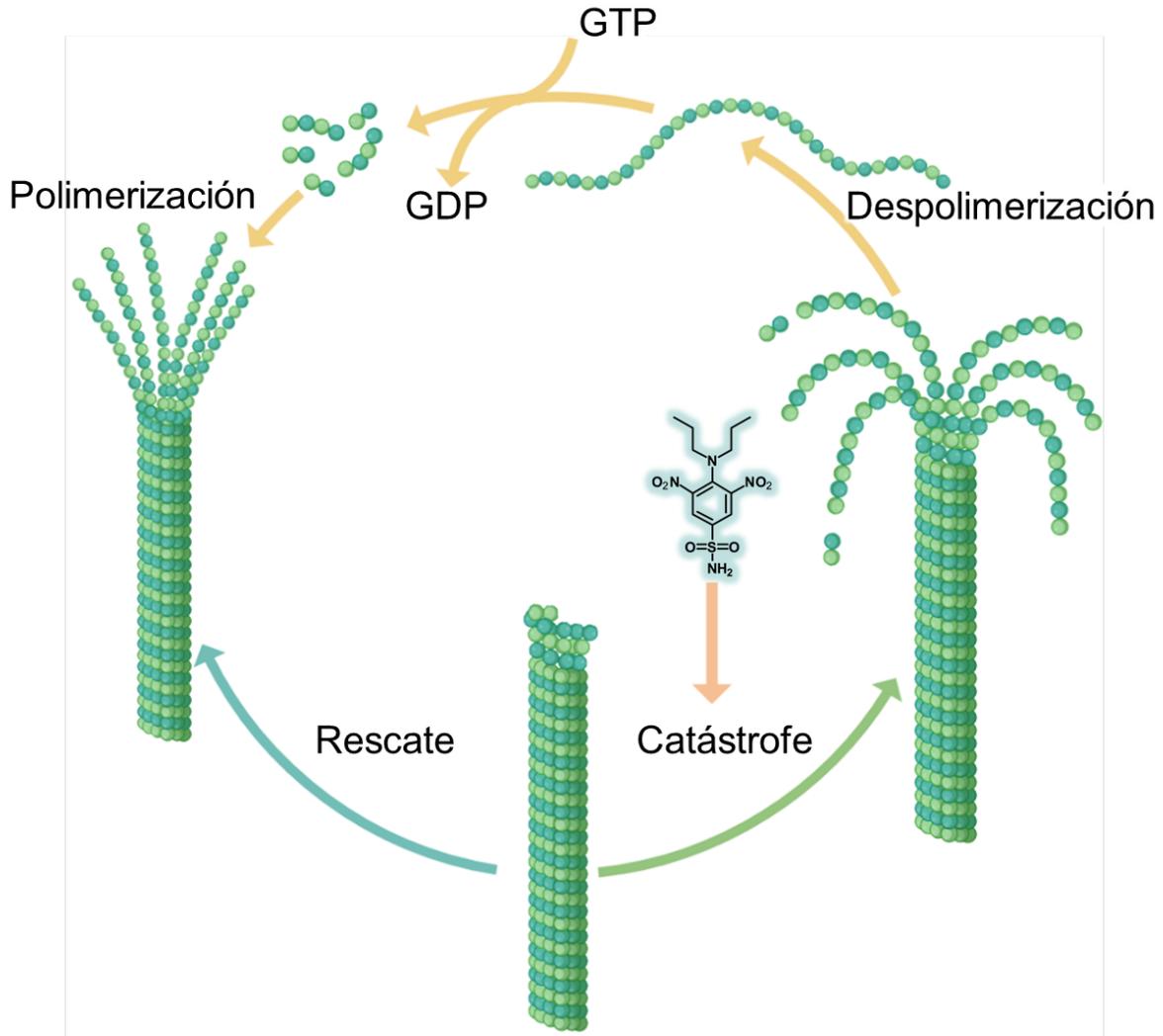
### II.2.3. Otros organismos no susceptibles

Estudios previos han demostrado que ORY no presenta ningún efecto citotóxico en líneas celulares sanas a bajas concentraciones ( $< 30 \mu\text{M}$ ).<sup>3,9,35</sup> Por ejemplo, la evaluación de ORY en líneas celulares de promesaeoloblastos aislados (HL-60) mostró una inhibición del 90 % a una concentración de  $50 \mu\text{M}$ ,<sup>15</sup> mientras que en células epiteliales de riñón de mono (VERO) se obtuvo una  $\text{CI}_{50} > 32 \mu\text{M}$ .<sup>12</sup> Adicionalmente, se ha reportado el uso de concentraciones superiores a los  $25 \mu\text{M}$  para detectar actividad antihelmíntica contra el nematodo modelo *C. elegans*.<sup>20</sup>

### II.3. La tubulina como blanco terapéutico de derivados de dinitroanilina

Los microtúbulos son polímeros del citoesqueleto esenciales en la célula para su supervivencia, mitosis, transporte y movilidad. Los microtúbulos se conforman principalmente de heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina, que interactúan entre sí para dar forma a los protofilamentos y a diferentes ensamblajes de microtúbulos. Los microtúbulos dobles son esenciales en la constitución de cilios y flagelos, mientras que los microtúbulos triples son constituyentes de centriolos y cuerpos basales. Además de los dímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina, otros miembros de la familia de la tubulina son las  $\gamma$ -tubulinas, que constituyen a los centriolos y los SPB (*spindle pole body*, por sus siglas en inglés), y las  $\delta$  y  $\epsilon$ -tubulinas, que están implicadas en los microtúbulos dobles y triples.<sup>27</sup> El carácter dinámico de polimerización y despolimerización de la tubulina es esencial en su función, por lo que su alteración puede derivar en la muerte celular (*Figura 2.9*).<sup>9</sup>

Estudios previos han demostrado que los derivados de dinitroanilina inhiben la polimerización de los microtúbulos al unirse selectivamente a la subunidad de  $\alpha$ -tubulina. Estos compuestos interfieren con la interacción longitudinal de los protofilamentos, ocasionando la ruptura de los microtúbulos y alterando varios procesos biológicos, tales como la segregación cromosomal, citocinesis, división del núcleo y motilidad celular.<sup>27</sup> Morrissette y colaboradores lograron determinar que la  $\alpha$ -tubulina era el blanco predilecto de ORY en *T. gondii* gracias a estudios de mutagénesis química dirigida.<sup>36</sup> En estos estudios, que datan del 2004, se lograron identificar más de 30 mutaciones en la  $\alpha$ -tubulina de *T. gondii* que alteraban la actividad antiprotozoaria de ORY.



**Figura 2.9.** Fenómeno de polimerización y despolimerización de la tubulina. A partir de heterodímeros de  $\alpha/\beta$  tubulina (verde y azul correspondientemente). En la fase de rescate, los protofilamentos y heterodímeros de  $\alpha/\beta$  tubulina se fosforila el GDP asociados a ellos, provocando la polimerización de la tubulina, así mismo este proceso se favorece con agentes estabilizadores promotores de la polimerización. En la fase de catástrofe, ocurre la desfosforilación de GTP en los heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina, ocasionando la despolimerización de la tubulina, proceso acelerado por agentes desestabilizadores de la tubulina.<sup>37</sup>

### II.3.1. Mutaciones en la $\alpha$ -tubulina

Dado que las tubulinas tienen un alto grado de conservación, un estudio de revisión reciente recopiló una lista de mutaciones de los aminoácidos, entre isotipos y especies, con un total de 489 mutaciones en la  $\alpha$ -tubulina, 729 en la  $\beta$ -tubulina, y 343 en las  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ -tubulinas. Esta lista de mutaciones, además de dar a conocer mutaciones puntuales registradas, tiene el

propósito de evaluar el rol de aminoácidos en específico debido a su conservación entre especies.<sup>38</sup>

Como se mencionó anteriormente, estudios experimentales han demostrado que ORY se une selectivamente a la  $\alpha$ -tubulina de plantas y protozoarios parásitos. Esto último ha sido confirmado gracias a la identificación de mutaciones de resistencia al tratamiento con ORY en esta subunidad de la tubulina. En la *Tabla 2.2*, se listan todas las mutaciones de resistencia a ORY reportadas hasta el 2019 en la  $\alpha$ -tubulina de plantas y protozoarios parásitos.

**Tabla 2.2.** Mutaciones de resistencia a ORY reportadas en la  $\alpha$ -tubulina de distintos organismos

Mutación	Organismo	Mutación	Organismo	Mutación	Organismo
V4L*	Tg <sup>39,40</sup>	S178 $\Delta$	At <sup>6</sup>	A273V	Tg <sup>40</sup>
S6I*	Tg <sup>39,40</sup>	S180F	At <sup>6</sup>	I275T*	Tg <sup>36,39,40</sup>
H8Y*	Tg <sup>36,39</sup>	V202F*	Lr <sup>8</sup> , Aa <sup>7</sup> .	S277F	At <sup>6</sup>
F24H*	Tg <sup>39,40</sup>	D205N	Cr <sup>41</sup>	A281T	At <sup>6</sup>
Y24H*	Cr <sup>41</sup>	A208T	Cr <sup>41</sup>	E284K	At <sup>6</sup>
H28Q*	Tg <sup>36,39,40</sup>	I209V	Tg <sup>42</sup>	S287P	Tg <sup>42</sup>
F49C*	Tg <sup>39,40</sup>	L230V	Tg <sup>42</sup>	A295V*	Tg <sup>36,39,40</sup>
F52L*	Tg <sup>36,39,40</sup>	I231T*	Tg <sup>36,39</sup>	M301T*	Tg <sup>36,39,40</sup>
F52Y*	Tg <sup>39,40</sup>	I235T*	Tg <sup>39,40</sup>	P325S	At <sup>6</sup>
F52I*	Tg <sup>36,39,40</sup>	I235L*	Tg <sup>39,40</sup>	P348L	Tg <sup>42</sup>
I93V	Tg <sup>42</sup>	I235V*	Tg <sup>36,39,40</sup>	T349I	At <sup>6</sup>
L125M*	Aa <sup>7</sup>	L238V*	Tg <sup>36,39</sup>	I355E	Tg <sup>42</sup>
G131R	Tg <sup>42</sup>	T239I*	Tg <sup>36,39,40</sup> , Sv <sup>9</sup> , Lr <sup>8</sup> .	V363A	Tg <sup>42</sup>
L136F*	Tg <sup>36,39,40</sup> , Sv <sup>9</sup> , Aa <sup>7</sup>	R243S*	Tg <sup>36,39,40</sup>	P364R	Tg <sup>42</sup>
N139K*	Tg <sup>36,39</sup>	R243C*	Tg <sup>36,39,40</sup>	D367V	Tg <sup>40</sup>
G142S*	Tg <sup>39</sup>	R243K*	Lr <sup>8</sup>	V371G	Tg <sup>42</sup>
S165T*	Tg <sup>36,39</sup>	R243M*	Lr <sup>8</sup>	I378M*	Tg <sup>36,39</sup>
S165A*	Tg <sup>36,39</sup>	V252L*	Tg <sup>36,39,40</sup>	M391I*	Tg <sup>36,39</sup>
S165P*	Tg <sup>36,39</sup>	Q256H	Tg <sup>42</sup>	F418I	Tg <sup>42</sup>
S171A	Tg <sup>42</sup>	M268T*	Tg <sup>39,40</sup>		

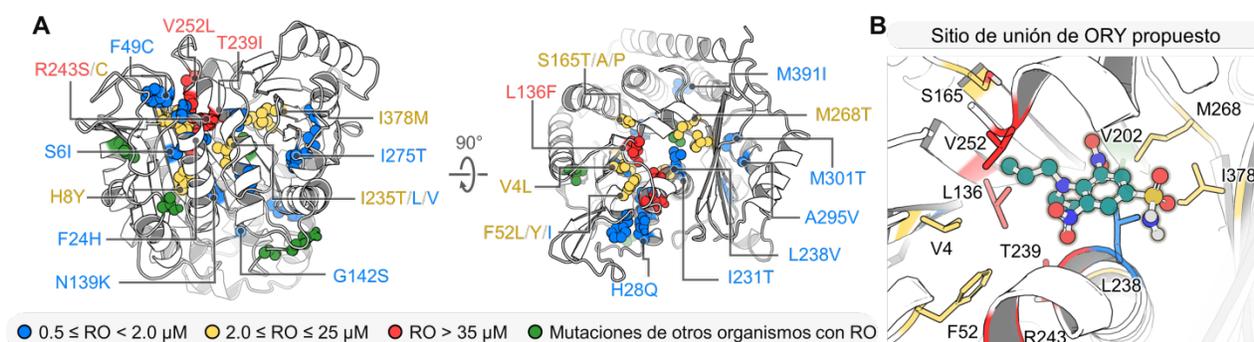
Tg, *Toxoplasma gondii*; At, *Arabidopsis thaliana*; Aa, *Alopecurus aequalis*; Lr, *Lolium rigidum*; Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*; Sv, *Setaria viridis*.  $\Delta$  deleción. (\*) Mutaciones de resistencia a ORY.

### II.3.2. Propuestas del sitio de unión

En anteriores investigaciones, se han propuesto diferentes posibles sitios de unión de las dinitroanilinas en la  $\alpha$ -tubulina. En estos trabajos, se relacionan las propuestas con mutaciones

ligadas a resistencia (ver *Figura 2.10A*).<sup>43</sup> Algunos de los modelos del sitio han sugerido que los derivados de dinitroanilina podrían unirse alrededor del residuo T239,<sup>44</sup> detrás de la asa "N",<sup>3,11,36</sup> en la interfase entre la  $\alpha/\beta$ -tubulina,<sup>45,46</sup> debajo de la asa "N" próximo a los residuos de T239 y F244<sup>47</sup> o en el sitio del GTP.<sup>23</sup>

Recientemente, nuestro grupo de investigación propuso el sitio de la pironetina de la  $\alpha$ -tubulina de *T. gondii* como el sitio de unión de la ORY (ver *Figura 2.10B*). Después de un análisis exhaustivo de la interacción de ORY en varios sitios de la  $\alpha$ -tubulina por medio de un acoplamiento molecular con el método *Wrap "N" Shake*, así como el análisis por dinámica molecular de ORY en el sitio de la pironetina. Los resultados de nuestro estudio mostraron alta afinidad y estabilidad de ORY por el sitio propuesto.<sup>48</sup>



**Figura 2.10.** (A) Distribución de 30 mutaciones reportadas en la  $\alpha$ -tubulina de *T. gondii* coloreada por su resistencia a ORY. Las concentraciones se muestran en la parte inferior de la figura. Otras mutaciones de resistencia relevantes encontradas en plantas se muestran en verde. (B) Representación de los residuos que constituyen el sitio de la pironetina en la  $\alpha$ -tubulina de *T. gondii*. Los residuos con mutaciones reportadas están coloreados conforme a lo indicado en el inciso (A).

A partir de la propuesta realizada por nuestro grupo, es necesario continuar con el estudio de la interacción de otros derivados de dinitroanilina con la  $\alpha$ -tubulina de *T. gondii* y comprender las diferencias de susceptibilidad al tratamiento con ORY en diferentes organismos.

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las infecciones causadas por parásitos son comunes en países en vías de desarrollo y se ha empezado a extender en países desarrollados por fenómenos de migración y su alta morbilidad. Estudios previos han demostrado que los agentes herbicidas derivados de la dinitroanilina, dentro de los que se encuentra la TFL y ORY, presentan actividad antiparasitaria contra protozoarios como *L. mexicana* (leishmaniosis), *T. gondii* (toxoplasmosis) y *P. falciparum* (malaria). Estos compuestos ejercen su actividad herbicida y antiparasitaria al inhibir el proceso de polimerización de los microtúbulos como resultado de su interacción con la proteína  $\alpha$ -tubulina. Recientemente, nuestro grupo de investigación propuso el posible sitio de unión de ORY en la  $\alpha$ -tubulina de *T. gondii*, tomando en cuenta la información de mutaciones de resistencia al tratamiento con esta molécula. En este trabajo, se busca evaluar diferentes derivados de dinitroanilina y el efecto de las variaciones en la secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -tubulina entre organismos susceptibles y no susceptibles para comprender las variaciones en la actividad biológica y poder diseñar nuevos compuestos antiprotozoarios. Los resultados de este trabajo serán un punto clave para continuar con la investigación en el desarrollo de nuevos tratamientos seguros y eficaces.

### **IV. HIPÓTESIS**

El uso de herramientas computacionales permitirá conocer el modo de unión y comportamiento dinámico de derivados de la orizalina a la  $\alpha$ -tubulina de protozoarios parásitos susceptibles y no susceptibles al tratamiento con esta molécula.

### **V. OBJETIVOS**

#### **V.1. Objetivo General**

Emplear herramientas computacionales para proponer y describir el modo de unión de los derivados de orizalina (ORY) a la  $\alpha$ -tubulina de protozoarios parásitos.

#### **V.2. Objetivos Particulares**

- Describir el comportamiento dinámico de complejos  $\alpha$ -tubulina de *T. gondii* con ORY y sus derivados estructurales.
- Caracterizar el comportamiento dinámico de ORY en la  $\alpha$ -tubulina de organismos susceptibles y no susceptibles.
- Determinar el tiempo de residencia de ORY en la  $\alpha$ -tubulina de *T. gondii* (susceptible) y *H. sapiens* (no susceptible).

## VI. METODOLOGÍA

En el presente trabajo, se realizó una revisión bibliográfica de los análogos de dinitroanilina con actividad antiprotozoaria reportada. De la biblioteca de compuestos recolectada, se seleccionaron a los compuestos con mayor potencia y similitud estructural con el compuesto de referencia (orizalina, ORY). Posteriormente, se hizo la preparación y construcción de los modelos tridimensionales de los compuestos, así como de los modelos de  $\alpha$ -tubulina de organismos susceptibles y no susceptibles. Con los modelos anteriores, se realizaron los estudios de acoplamiento y dinámica moleculares para determinar el modo de unión y comportamiento dinámico de los complejos proteína-ligando. En las siguientes subsecciones, se describe detalladamente la metodología seguida para este proceso.

### VI.1. Preparación de ligandos

#### VI.1.1. Predicción del $pK_a$

Mediante el empleo del software Marvin Sketch de ChemAxon<sup>49</sup>, se predijo el menos logaritmo de la constante de disociación ácida ( $pK_a$ ) de las moléculas que presentaban grupos ácidos en su estructura. Con base en este valor, se determinó el estado de protonación de estas moléculas a pH 7.0 (ver *Tabla 6.1*).

**Tabla 6.1.** Valores de  $pK_a$  y abundancia de especies a pH 7.0 de ORY y sus derivados

Clave	Grupo ácido	$pK_a$	Abundancia de especies a pH 7.0
ORY	Sulfonamida	9.55	99.72% de la especie protonada (neutra)
<b>GB-II-5</b> (DNT-12)	Sulfonamida	7.53	22.71% de la especie desprotonada (cargada)
<b>GB-II-46</b> (DNT-13)	Sulfonamida	9.55	99.72% de la especie protonada (neutra)

#### VI.1.2. Construcción de los ligandos

Se empleó el código SMILES canónico de ORY, GB-II-5 (DNT12) y GB-II-46 (DNT-13) (ver *Anexo Tabla 11.1*) para la construcción de las estructuras tridimensionales con el software Avogadro<sup>50</sup>. Con este mismo programa, se llevó a cabo la optimización de la geometría inicial y minimización de la energía de las estructuras químicas empleando el campo de fuerza *Generalized AMBER force field* (GAFF)<sup>51</sup> con el algoritmo *steepest descent*<sup>52</sup>. Las estructuras

fueron sometidas a una segunda optimización utilizando el funcional híbrido B3LYP<sup>53</sup> y la base 6-31G(d, p)<sup>54</sup> con el programa Gaussian 16<sup>55</sup>. Los archivos de coordenadas obtenidos de esta segunda minimización de energía fueron enviados al programa MGLTools<sup>56</sup> para calcular las cargas parciales con el método de Gasteiger-Marsili<sup>57</sup>, fusionar los hidrógenos no polares a la estructura y asignar los tipos de átomos de AutoDock<sup>56</sup>. De este último paso, se almacenó el archivo de coordenadas PDBQT para su empleo en el acoplamiento molecular.

### VI.1.4. Parametrización para el campo de fuerza AMBER

Las estructuras optimizadas de los análogos de la dinitroanilina y del GTP<sup>58</sup> fueron enviados al servidor ACPYPE<sup>59</sup> para el cálculo de las cargas parciales con el método AM1-BCC<sup>60</sup> y obtención de las topologías de los ligandos para el campo de fuerza AMBER<sup>61</sup>.

## VI.2. Preparación de proteínas

### VI.2.1. Alineamiento de secuencias

Se identificaron y recopilaron las secuencias de aminoácidos de la  $\alpha$ -tubulina de cuatro parásitos protozoarios y las 7 isoformas de humano empleando el formato FASTA de la base de datos UniProt<sup>62</sup>. De esta última, se eligieron a las secuencias de *T. gondii* (TgAT, P10873), *P. falciparum* (PfAT, P14642), *L. mexicana* (LmAT, E9AP62), *G. intestinalis* (GiAT, A8BPC0) y *Homo sapiens* (HsAT, Q71U36), las cuales se encuentran revisadas y validadas por Swiss-Prot<sup>63</sup>. En el caso de la secuencia de *L. mexicana*, se eliminaron los primeros 100 aminoácidos de la secuencia para hacerla coincidir con las restantes, teniendo como referencia el fragmento de inicio MRE (metionina-arginina-ácido glutámico).

### VI.2.2. Modelado por homología

Se construyeron los modelos tridimensionales de  $\alpha$ -tubulina de los organismos antes mencionados empleando el servidor SWISS-MODEL<sup>64</sup>. Para este trabajo, se utilizó como molde a la estructura de  $\alpha$ -tubulina de *Gallus gallus* con clave del *Protein Data Bank* (PDB) 5fnv<sup>65</sup>. Este molde fue seleccionado debido a que en él se expone el sitio de unión de la pironetina, el cual presenta varios de los residuos de resistencia al tratamiento con ORY<sup>66</sup>. A los modelos obtenidos, se les realizó una optimización de su geometría y minimización de energía con el programa UCSF Chimera<sup>67</sup>, para posteriormente realizar una validación con SWISS-MODEL<sup>64</sup> (ver *Anexos Figuras 11.1-11.5*).

### VI.3. Acoplamiento molecular

Se realizó el acoplamiento molecular rígido-flexible de ORY, GB-II-5 y GB-II-46 en el sitio de unión de la pironetina con el programa AutoDock Vina<sup>68</sup>. Se centró la caja de búsqueda en el carbono  $\zeta$  del aminoácido 202, estableciendo un tamaño de caja de 25 x 25 x 25 Å y una exhaustividad en el algoritmo de búsqueda de 8. Del resultado de acoplamiento, se eligieron las poses (modos de unión) con mejor puntuación (*score*).

### VI.4. Dinámica molecular

#### VI.4.1. Simulaciones convencionales

Para la dinámica molecular atomística convencional se utilizó el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN<sup>69</sup> implementado en el programa GROMACS 2021.3<sup>70</sup>. En todos los sistemas, se incorporaron los parámetros del GTP, Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> a la topología del sistema, así como la del ligando en el caso de los complejos. Los sistemas fueron solvatados con moléculas de agua TIP3P en una caja cúbica que se extendía al menos 1 nm de la proteína. Se reemplazaron moléculas de agua con iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> de forma aleatoria para neutralizar al sistema y alcanzar una concentración de 0.15 M. A cada sistema se sometió a una minimización de energía y un equilibrio durante 1 ns bajo los ensambles canónico (NVT) e isotérmico-isobárico (NPT). Se aplicaron restricciones holonómicas a todos los enlaces usando el algoritmo LINCS. Posteriormente, se fijó la temperatura del sistema a 300 K con el termostato modificado de Berendsen (reescalamiento de velocidades, *V-rescale*)<sup>71</sup> y se estableció una presión de 1 bar con el baróstato de Berendsen<sup>72</sup> para ambos ensambles. Finalmente, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular NPT de 200 ns sin restricciones empleando el algoritmo del baróstato de Parrinello-Rahman.

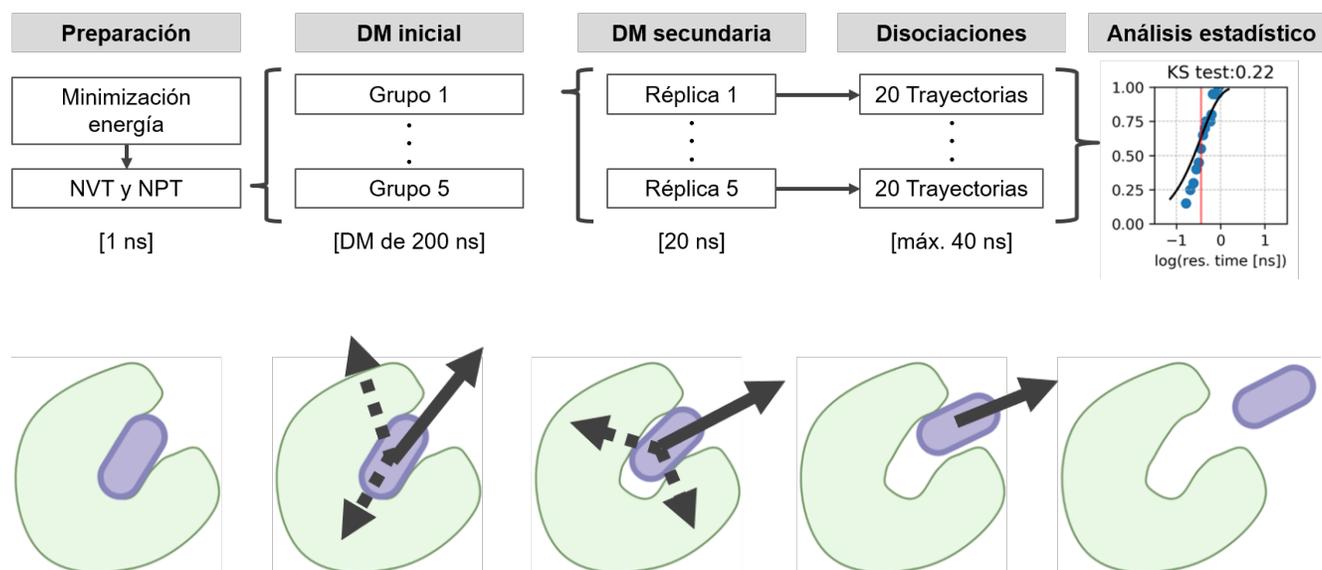
A partir de los resultados de acoplamiento molecular obtenidos con AutoDock Vina, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular de ORY, GB-II-5 y GB-II-46 con la  $\alpha$ -tubulina de *Toxoplasma gondii*. Asimismo, se realizó dinámica molecular de los complejos de ORY con los modelos de  $\alpha$ -tubulina de organismos susceptibles (TgAT, LmAT y PfAT) y no susceptibles (GiAT y HsAT). En ambos casos, se emplearon los parámetros mencionados en el punto anterior.

Para el análisis de las dinámicas moleculares se utilizaron las herramientas internas de GROMACS. Para el análisis de análisis de la desviación de la raíz cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) de las proteínas respecto a su cadena principal, fluctuación de la raíz

cuadrática medía (RMSF, por sus siglas en inglés), puentes de hidrógeno, análisis de grupos (*clustering*) de los últimos 100 ns de simulación con un valor de corte de 0.15 nm y análisis de contactos. Se utilizó la librería de python MDAnalysis<sup>73</sup> para el cálculo del centro geométrico del anillo de benceno de ORY, GB-II-5 y GB-II-46, y su ángulo respecto a los anillos aromáticos en el sitio. El análisis de la contribución energética por residuo con los ligandos, se calculó con el método MM/PBSA (*Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area*) con la herramienta *g\_mmpbsa*.<sup>74</sup> PLIP v2.2.2<sup>75</sup> fue usado para la detección de interacciones entre los ligandos y las  $\alpha$ -tubulinas de los organismos. Finalmente, para el cálculo de la variación del volumen de la cavidad respecto al tiempo de simulación se utilizó POVME 3.0.<sup>76</sup>

#### VI.4.2. Dinámica molecular acelerada

Se determinó el tiempo de residencia de ORY en los modelos de TgAT (susceptible) y HsAT (no susceptible) empleando la metodología de dinámica molecular de aceleración aleatoria ( $\tau$ RAMD, *tau-Random Acceleration Molecular Dynamics*)<sup>77</sup> implementada en el programa GROMACS v2021. En la *Figura 6.1*, se presenta un diagrama de flujo en el que se muestra el trabajo seguido para la obtención del tiempo de residencia del ORY en la  $\alpha$ -tubulina.

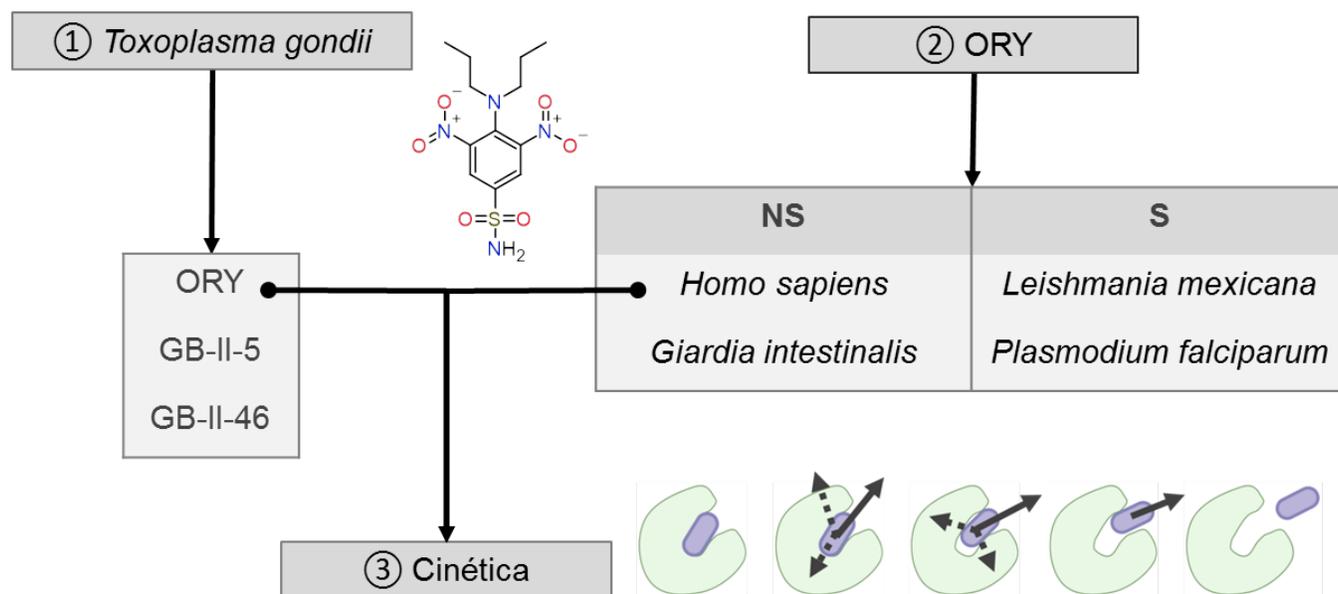


**Figura 6.1.** Diagrama de trabajo empleado para la dinámica molecular acelerada. La figura al pie del diagrama esquematiza el proceso de dinámica molecular acelerada, en la cual se presenta con vectores la salida del ligando del sitio con el sometimiento de una fuerza en una dirección aleatoria, la cual puede ser favorable a la salida del ligando (flecha sólida) o no aportar movimiento (flecha intermitente).

Como punto de partida, se extrajo la conformación más representativa de ORY en las simulaciones de dinámica molecular de 200 ns con TgAT y HsAT empleando un análisis de grupos (*clustering*). Los complejos fueron sometidos a una dinámica molecular de 20 ns estableciendo una presión de 1 bar con el baróstato Parrinello-Rahman<sup>78</sup> y una temperatura de 300 K con el termostato Nosé-Hoover<sup>79</sup>. Se utilizó una fuerza de 9.56 kcal/mol Å para las simulaciones, la dirección de la fuerza es elegida aleatoriamente cada vez que el centro de masa del ligando no se mueve 0.025 Å de su posición anterior. Las coordenadas fueron salvadas cada 10 ps. Las simulaciones se detienen cuando se alcanza un tiempo de simulación de 40 ns o el movimiento del ligando alcanza 40 Å de su posición inicial. Al finalizar, se obtuvo un set de 20 trayectorias de disociación, por cada una de las 5 réplicas, con lo cual se calculó el tiempo de residencia ( $t_R$ ) y su desviación estándar mediante un análisis estadístico de distribución normal.

**VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En el *Esquema 7.1*, se muestra el flujo de trabajo abordado en el presente capítulo. Primero, se realizó el análisis de interacción de TgAT con ORY y sus derivados GB-II-5 y GB-II-46. En la segunda sección, se expone la interacción de ORY con la  $\alpha$ -tubulina de distintos organismos susceptibles (S: LmAT y PfAT) y no susceptibles (NS: HsAT y GiAT) al tratamiento con este compuesto. Finalmente, se mostrará el análisis de tiempo de residencia de ORY en los modelos de TgAT y HsAT.



**Esquema 7.1.** Diagrama de trabajo empleado para la caracterización de la interacción de la  $\alpha$ -tubulina con diferentes ligandos, la unión de ORY con organismos susceptibles (S) y no susceptibles (NS) y el tiempo de residencia de ORY en TgAT y HsAT.

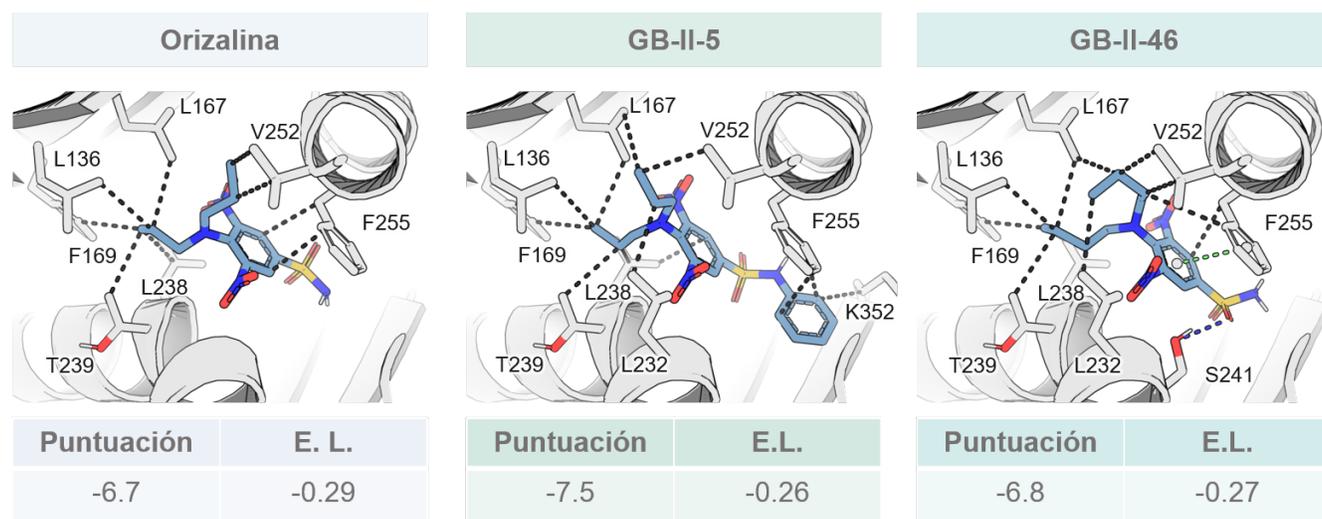
**VII.1. Perfil de interacción de ORY y sus derivados con TgAT**

Como se mencionó anteriormente, nuestro grupo de investigación propuso y caracterizó al sitio de la pironetina como el posible sitio de unión de ORY, además del modo de unión y perfil de interacción de ORY en TgAT. En este trabajo de tesis, se llevó a cabo el acoplamiento molecular de ORY y dos de sus derivados (GB-II-5 y GB-II-46) en el sitio de la pironetina en TgAT. El derivado GB-II-5 presenta una extensión de estructura mediante la adición de un grupo fenilo como sustituyente de la sulfonamida, mientras que GB-II-46 resulta de un aumento de cadena (homologación) del sustituyente de dipropilamina.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Figura 7.1*, se muestra el perfil de interacción del acoplamiento con mejor puntuación (*score*) de estos tres compuestos en TgAT. Los resultados del acoplamiento muestran que la posición espacial de los ligandos en el sitio de la pironetina es similar en todos los casos, disponiendo al sustituyente de dipropilamina hacia la cavidad hidrofóbica, formando interacciones hidrofóbicas con los residuos L136, L167, F169, L238, T239 y V252. El anillo aromático de la dinitroanilina se sitúa paralelo al residuo F255, formando un apilamiento  $\pi$ - $\pi$  de este residuo con la GB-II-46. La disposición de estos grupos sugiere además que esta interacción podría formarse con los otros dos compuestos. Finalmente, el grupo sulfonamida se dispuso hacia la entrada del sitio (región hidrofílica) en todos los casos, formando la GB-II-46 un puente de hidrógeno con la S241.

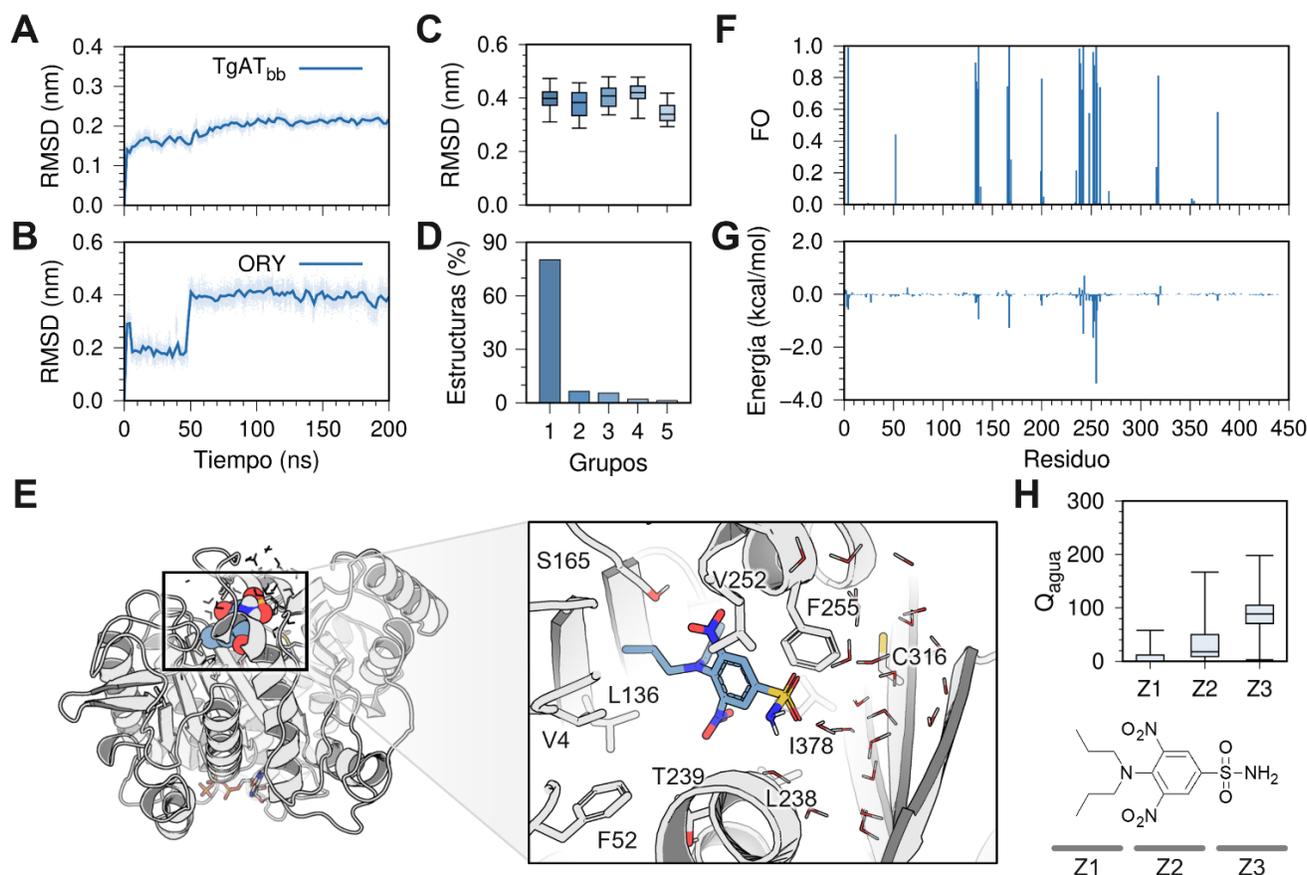
Al comparar los datos del puntaje obtenido por AutoDock Vina<sup>68</sup> y calcular la eficiencia del ligando, es posible determinar que GB-II-5 podría presentar mayor afinidad por el sitio que GB-II-46, aunque ambas superando la afinidad de ORY. El acoplamiento molecular permitió determinar el posible modo de unión de los tres compuestos estudiados en TgAT. Sin embargo, para caracterizar su estabilidad y perfil de interacción a través del tiempo, fue necesario llevar a cabo simulaciones independientes de dinámica molecular de 200 ns de TgAT con ORY, GB-II-5 y GB-II-46.



**Figura 7.1.** Resultados del acoplamiento molecular de ORY, GB-II-5 y GB-II-46 en el sitio de la pironetina de la  $\alpha$ -tubulina de *T. gondii*. Con líneas punteadas se muestran las interacciones hidrofóbicas (negro), puente de hidrógeno (azul) y apilamiento  $\pi$ - $\pi$  (verde). Al pie de las figuras se reporta la puntuación (*score*) y eficiencia de ligando (E.L.) obtenidas en el acoplamiento molecular.

**VII.1.1. Caracterización dinámica de ORY en TgAT**

El análisis de la desviación de la raíz cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) de la dinámica molecular de ORY con TgAT mostró en primera instancia que la estructura de la  $\alpha$ -tubulina fue estable en el tiempo de simulación y no hubo un cambio significativo en su estructura terciaria (Figura 7.2A). Por su parte, el análisis de RMSD de la posición de ORY presentó un ligero aumento a los 50 ns de simulación, lo que sugirió un cambio en su orientación en el sitio respecto a la posición inicial obtenida durante el estudio de acoplamiento molecular (Figura 7.2B). A pesar de esto, el análisis por agrupamiento realizado a los últimos 100 ns de simulación (Figura 7.2C y D) mostró que ORY mantiene un modo de unión y una orientación muy similar al del acoplamiento durante casi el 80 % de la simulación (Figura 7.2E).

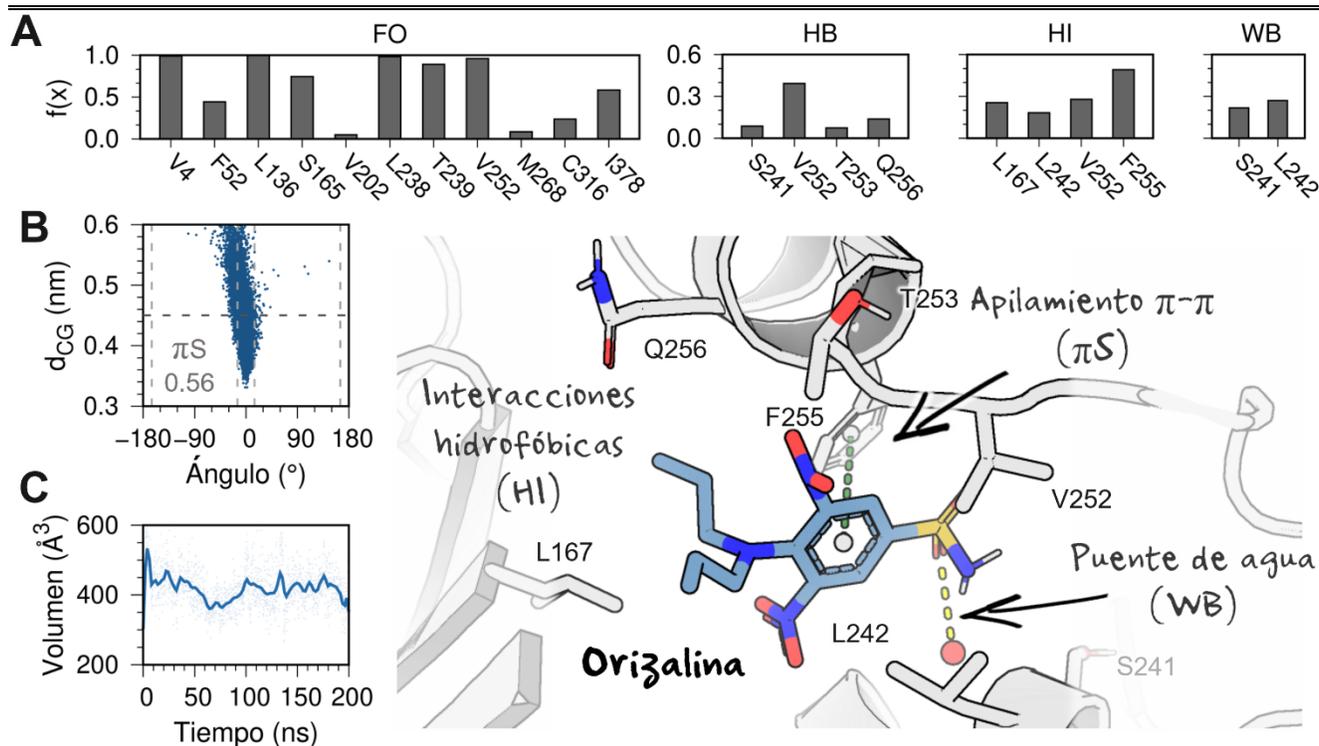


**Figura 7.2.** Dinámica molecular de ORY en TgAT. Diagrama de la desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) de (A) la estructura principal de  $\alpha$ -tubulina y (B) ORY. (C) RMSD y (D) porcentaje de estructuras por grupo provenientes del análisis por grupos. (E) Modo de unión más representativo de ORY en TgAT. Análisis de contactos (F) y contribución energética (G) por residuo con ORY. (H) Contactos de las diferentes zonas de ORY con agua, a lo largo del tiempo de simulación. Las cajas muestran un intervalo de variación de un mínimo a un máximo, usando el primer (15.0 %), segundo (50.0 %) y tercer (85.0 %) cuantiles.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Al analizar el factor de ocupación (FO) de ORY con los residuos que constituyen al sitio de unión, fue posible detectar que este compuesto interactuó por un mayor tiempo con los residuos V4, L136, L167, V200, V252, F255, M268, C316 e I378 (*Figura 7.2F*). Adicionalmente, el análisis de contribución energética por residuo mostró que F255 es el que más aporta a la estabilización de ORY en TgAT, posiblemente debido al apilamiento tipo  $\pi$ - $\pi$  que se forma entre los anillos aromáticos de ambos (*Figura 7.2G*). Además de la interacción con los residuos del sitio de unión de la pironetina, se estudiaron los contactos de ORY con las moléculas de agua que ingresan al sitio. Para tener una mejor comprensión de la contribución de los sustituyentes en la interacción con moléculas de agua, se dividió a ORY en tres zonas: dipropilamina (Z1), dinitrobenceno (Z2) y sulfonamida (Z3) (*Figura 7.2H*). A lo largo del tiempo de simulación, la zona que más contactos obtuvo fue Z3, ya que esta zona se posicionó hacia la parte exterior de la cavidad (sitio de entrada). Por su parte, los grupos nitro parecen impedir el ingreso de moléculas de agua hacia la cavidad hidrofóbica, donde se localiza el sustituyente de dipropilamina. Los resultados del perfil de interacción de ORY con los aminoácidos del sitio de la pironetina de TgAT, además del análisis con moléculas de agua aledañas, concuerdan con los estudios previos realizados en el mismo sistema.<sup>48</sup>

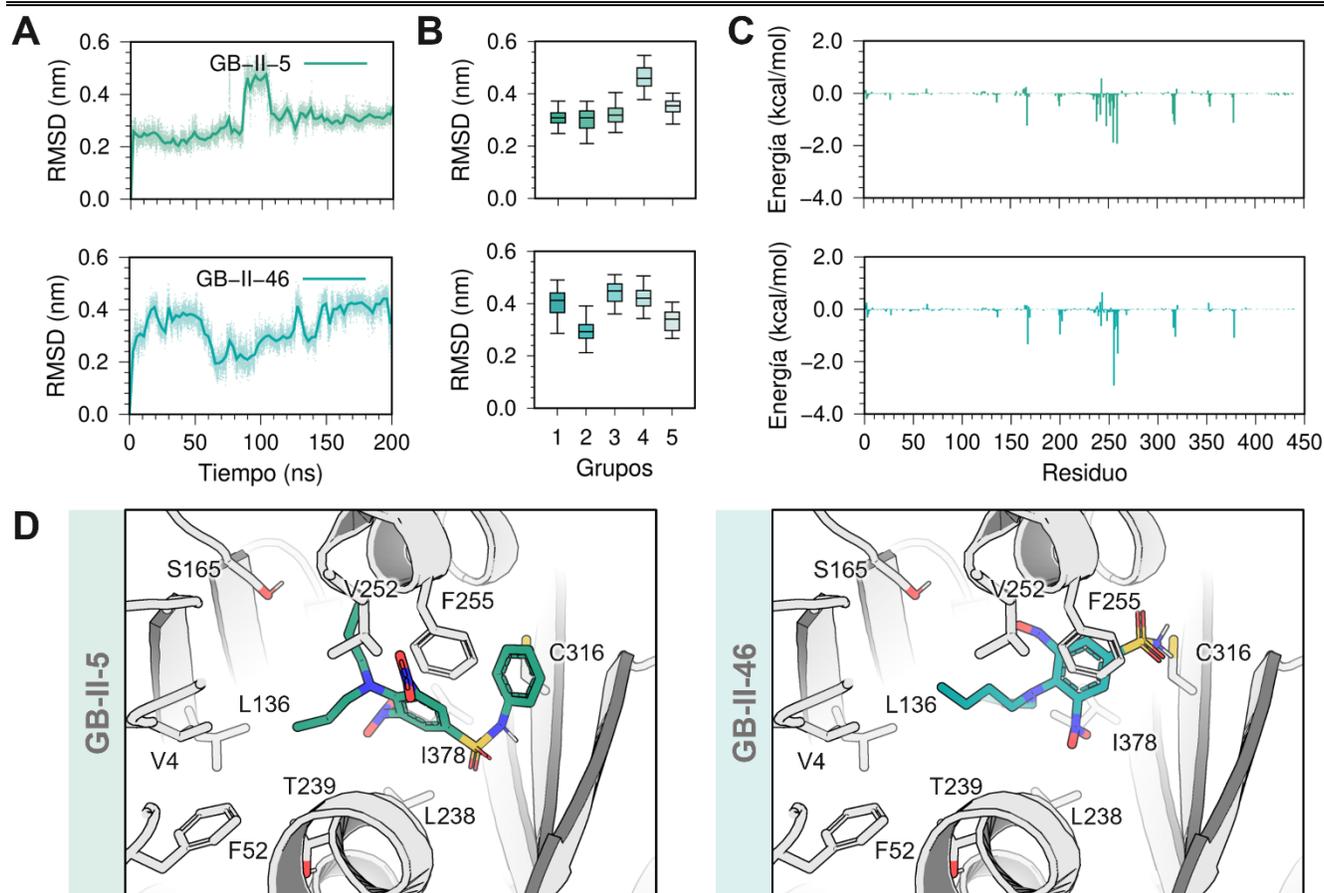
Con la finalidad de profundizar en el perfil de interacción de ORY en TgAT, se analizaron de forma individual los contactos de este compuesto con los residuos que componen al sitio (*Figura 7.3A*). De este análisis, resulta interesante notar que varios de los aminoácidos que presentan un mayor número de contactos tienen mutaciones reportadas que generan resistencia a ORY, dentro de los que se encuentran V4, F52, L136, L238, T239, V252 e I378. Al analizar el tipo de interacción que presenta ORY con estos residuos, encontramos que el ligando forma puentes de hidrógeno (HB) con la cadena principal V252 e interacciones hidrofóbicas (HI) con su cadena lateral. Sin embargo, la interacción hidrofóbica más importante se detectó con la cadena lateral de F255 debido al apilamiento  $\pi$ - $\pi$ . Este apilamiento  $\pi$ - $\pi$  se presentó el 56.0 % del tiempo simulado al considerarse una distancia entre los centros geométricos de los anillos aromáticos ( $d_{CG}$ ) menor a 0.45 nm y un ángulo de  $15^\circ$  entre sus planos ( $0^\circ \pm 15^\circ$  y  $180^\circ \pm 15^\circ$ ) (*Figura 7.3B*). Otra interacción identificada durante el estudio es un puente de agua (WB) entre la sulfonamida de la orizalina y los residuos S241 y L242. La predominancia de esta interacción a lo largo del tiempo de simulación nos indica que este puente podría jugar un papel importante en la afinidad de ORY por el sitio. Cabe mencionar que durante la simulación no se detectaron variaciones significativas en el volumen de la cavidad (*Figura 7.3C*).



**Figura 7.3.** Perfil de interacción de ORY en el TgAT. (A) Factor de ocupación (FO) de contactos e interacciones de puente de hidrógeno (HB), hidrofóbicas (HI) y puentes de agua (WB) de ORY en el sitio de unión. (B) Diagrama de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  de orizalina. (C) Variación del volumen de la cavidad del sitio de unión a lo largo del tiempo de simulación.

### VII.1.2. Caracterización dinámica de derivados de ORY en TgAT

Se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular de GB-II-5 y GB-II-46 en TgAT para comparar su comportamiento a través del tiempo con ORY (Figura 7.4). El compuesto GB-II-5 mostró ser estable en toda la simulación presentando sólo una pequeña variación debido al movimiento del fenilo de la sulfonamida (Figura 7.4A). Por su parte, el derivado GB-II-46 presentó mayores fluctuaciones durante la simulación debido a la alta flexibilidad de las cadenas alquílicas. Realizando un análisis de grupos, se observó que los grupos obtenidos en la simulación de GB-II-5 son bastante parecidos entre sí, lo que concuerda con su estabilidad en el sitio a lo largo del tiempo (Figura 7.4B). Caso contrario, el análisis por grupos GB-II-46 muestra una alta variabilidad, esto nuevamente debido al aumento de sus grados de libertad en la cadena alquílica. Respecto a los aminoácidos con los que interactúan ambos derivados, se observa que los residuos que más contribuyen a la afinidad de los ligandos por el sitio son los mismos que con ORY (Figura 7.4C). Ambos ligandos conservaron la misma orientación a pesar de las variaciones detectadas (Figura 7.4D).

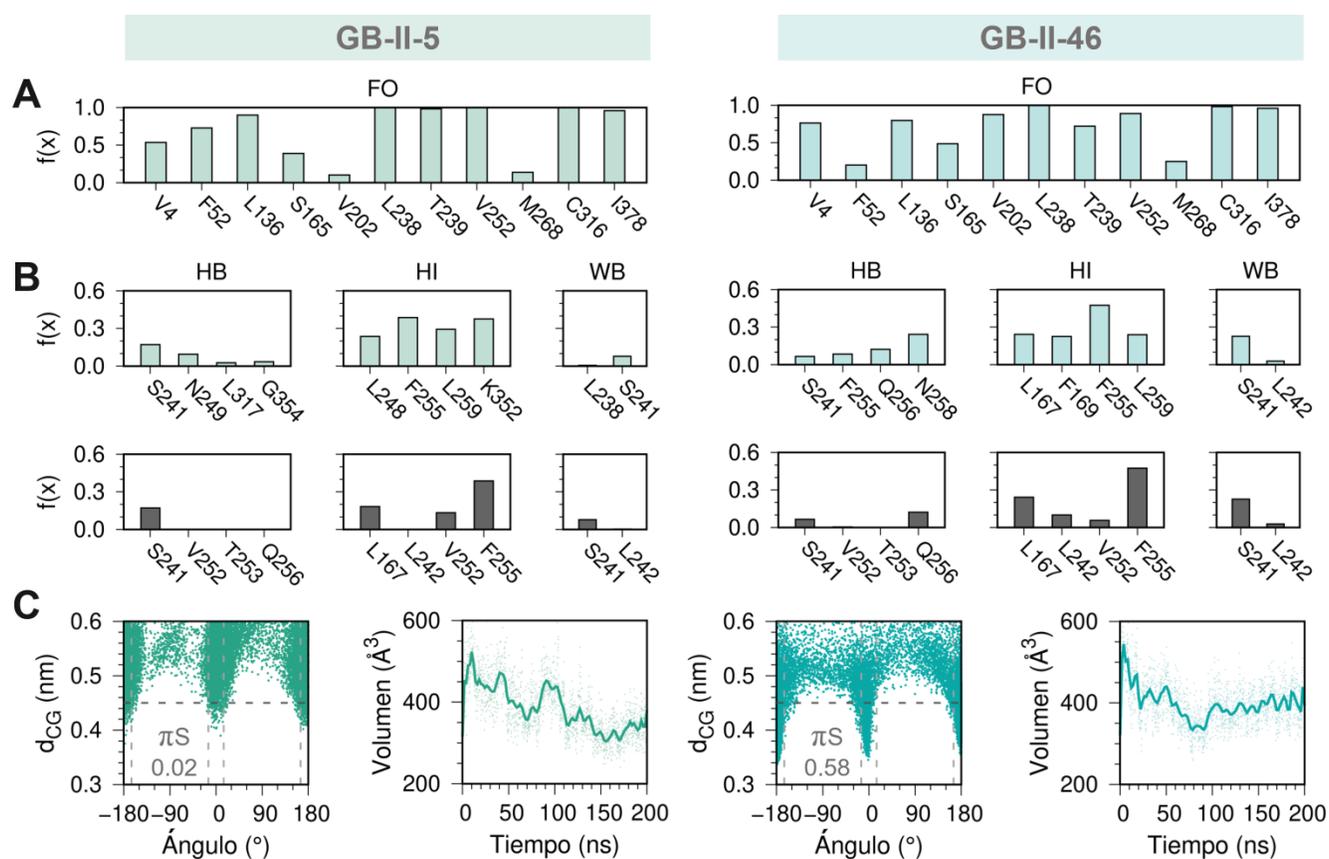


**Figura 7.4.** Perfil de análisis de la dinámica molecular de GB-II-5 (parte superior) y GB-II-46 (parte inferior) en el sitio de la pironetina de  $\alpha$ -tubulina. (A) Diagrama de la desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) de GB-II-5 y GB-II-46 y (B) análisis por grupos. Las cajas muestran un intervalo de variación de un mínimo a un máximo, usando el primer (15.0 %), segundo (50.0 %) y tercer (85.0 %) cuantiles. (C) Contribuciones energéticas por residuo para GB-II-5 y GB-II-46. (D) Modo de unión más representativo de GB-II-5 y GB-II-46 en el sitio de unión.

Extendiendo el análisis del perfil de interacción de los derivados estudiados, encontramos que tanto GB-II-5 como GB-II-46 conservan los mismos contactos con los residuos del sitio de unión de TgAT que los observados con ORY (Figura 7.5A). A pesar de esto, hubo algunas variaciones en cuanto a los residuos involucrados en las principales interacciones intermoleculares (Figura 7.5B). Por ejemplo, ambos derivados perdieron la interacción de puente de hidrógeno con V252, manteniendo únicamente en común este tipo de interacción con S241. Respecto a las interacciones hidrofóbicas, nuevamente la interacción con el residuo F255 resultó ser la más predominante. Sin embargo, al analizar el apilamiento  $\pi$ - $\pi$  entre los sistemas aromáticos de los derivados y F255, se encontró que, a diferencia de ORY y GB-II-

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

46, GB-II-5 no interactúa de esta forma con este residuo (*Figura 7.5C*). Esto último se debe a que la sustitución en la sulfonamida desplaza al ligando hacia el interior del sitio de unión, disminuyendo significativamente el volumen de la cavidad e impidiendo que éste se oriente correctamente con el anillo aromático del residuo F255. Además, el cambio en la orientación, volumen de la cavidad y presencia del sustituyente fenilo podrían ser la causa de la disminución de los puentes con moléculas de agua en las simulaciones con el derivado GB-II-5. Adicional a la interacción hidrofóbica con F255, se identificaron residuos que presentaron mayores contribuciones que no habían sido detectados en ORY. Esto último debido a que la extensión de la estructura en ambos derivados permitió ampliar las regiones de contactos hidrofóbicas con los residuos de la entrada (GB-II-5) o de la cavidad hidrofóbica (GB-II-46).



**Figura 7.5.** Perfil de interacción de GB-II-5 (izquierda) y GB-II-46 (derecha) en TgAT. (A) Factor de ocupación (FO) de contactos e (B) interacciones de puente de hidrógeno (HB), hidrofóbicas (HI) y puentes de agua (WB) de los derivados de ORY en el sitio de unión. (C) Diagrama de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  (izquierda) y variación del volumen del sitio de la pironetina a lo largo del tiempo de simulación (derecha).

VII.2. Unión de ORY a la  $\alpha$ -tubulina de organismos susceptibles y no susceptibles

VII.2.1. Comparación entre sitios de unión

En el presente trabajo, se realizó una comparación de la secuencia de aminoácidos de TgAT con las secuencias de protozoarios, organismos susceptibles (*P. falciparum* y *L. mexicana*) y no susceptibles al tratamiento con ORY (*G. intestinalis* y *H. sapiens*) (ver Figura 7.5).

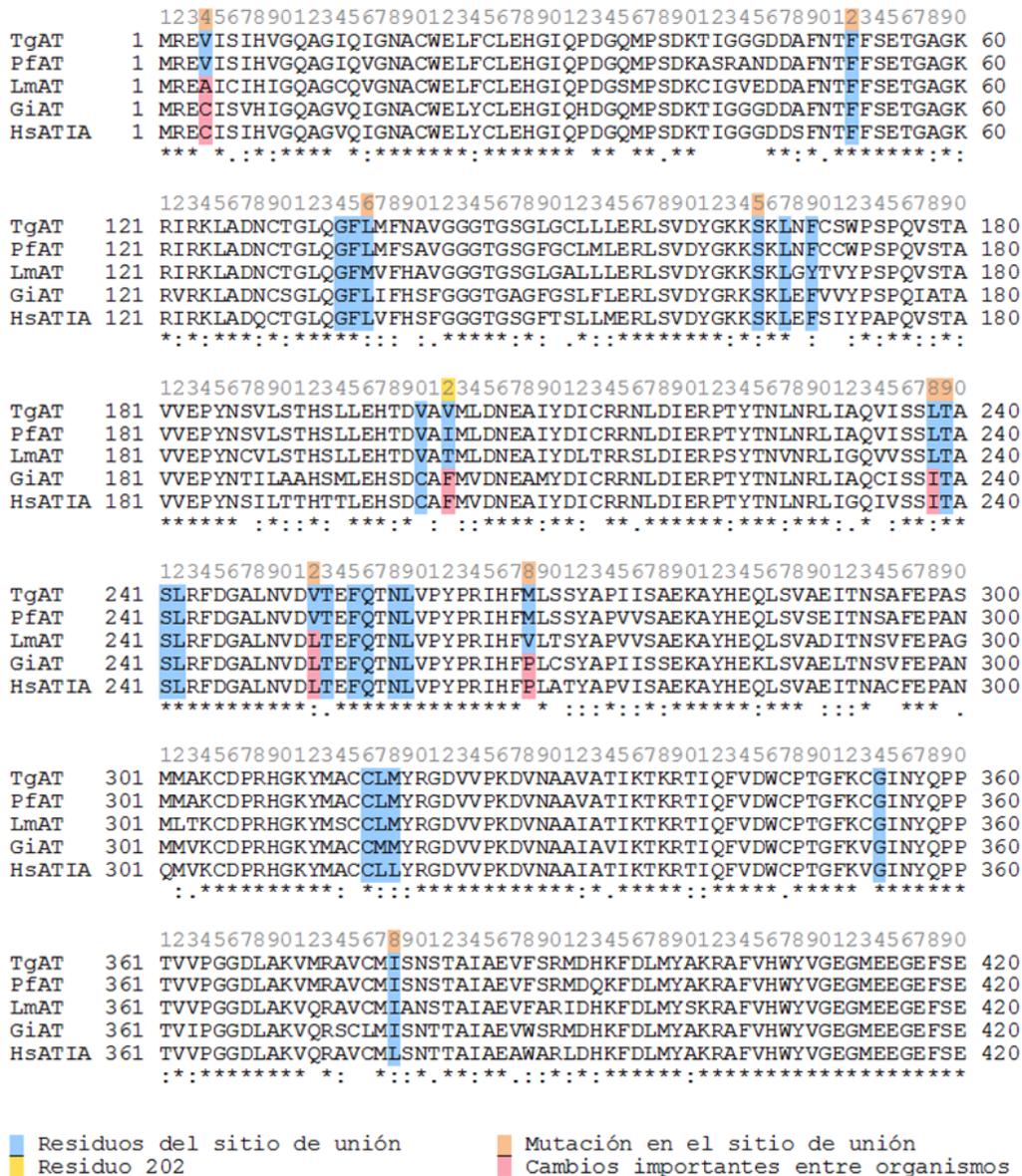


Figura 7.5. Alineamiento múltiple de de secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ -tubulina de organismos susceptibles (TgAT, PfAT y LmAT) y no susceptibles (Gi y Hs) al tratamiento con ORY. Se muestran los residuos que componen al sitio de unión propuesto (azul), mutaciones reportadas (naranja), variaciones importantes entre organismos (rosa) y énfasis en el residuo 202 (amarillo).

Este alineamiento múltiple de secuencias nos permitió detectar variaciones importantes en el sitio de la pironetina que podrían explicar la ausencia de susceptibilidad ante el tratamiento, dentro de las que se encuentran V4C, V202F, L238I, V252L y M268P. Además, estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que variaciones en estas posiciones afectan significativamente la afinidad de ORY por TgAT,<sup>36,38</sup> demostrando su relevancia en la composición del sitio de unión. De estas sustituciones, el cambio de un residuo pequeño (ej. valina, isoleucina y treonina) por fenilalanina en la posición 202 fue identificada recientemente como una de las principales causas de resistencia en plantas<sup>8</sup> y baja susceptibilidad en líneas celulares de humano.<sup>12</sup> Este alineamiento de secuencias sugiere que el sitio propuesto por nuestro grupo podría explicar la razón de los cambios de susceptibilidad al tratamiento con ORY.

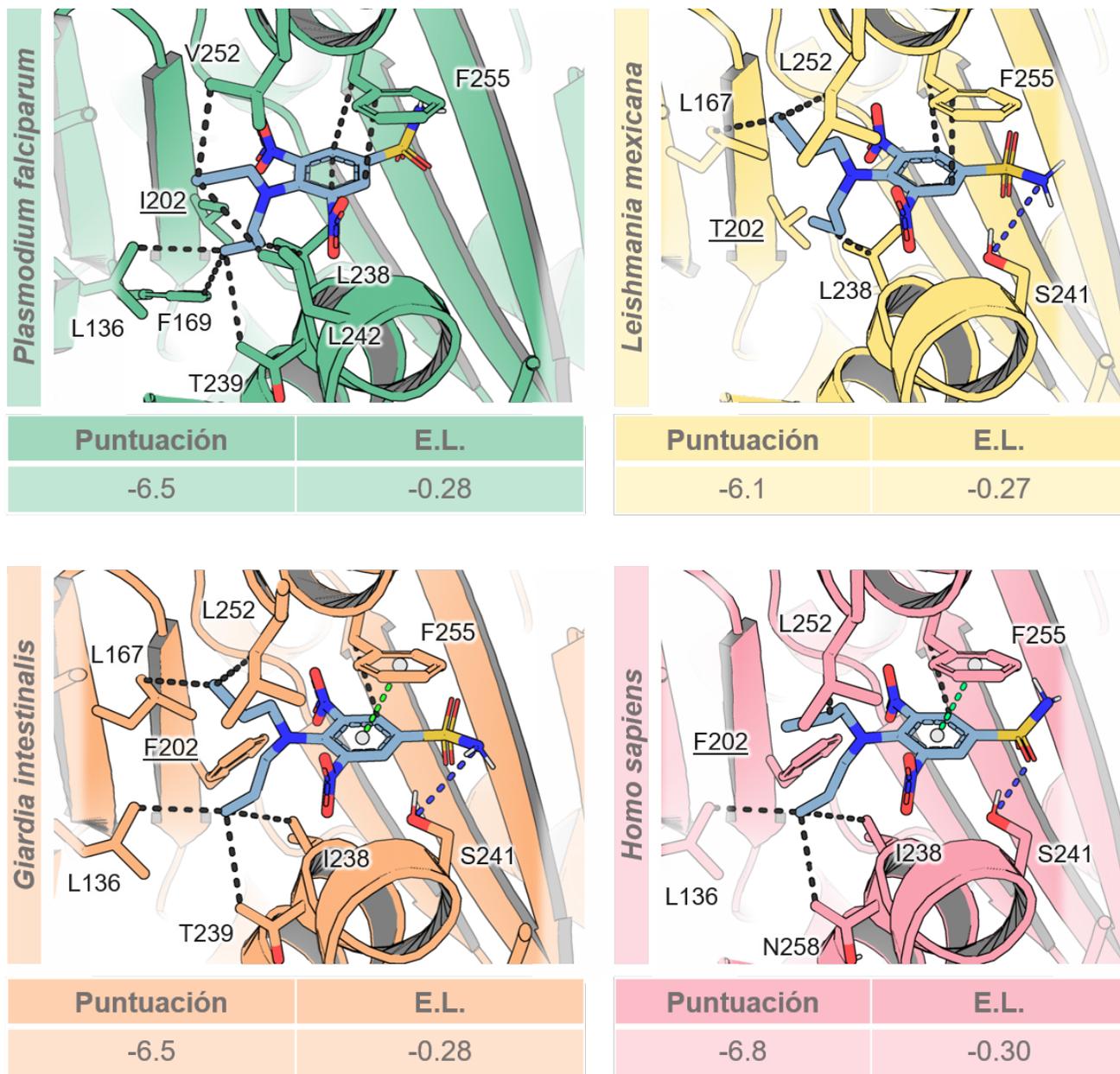
Con respecto al efecto de estas mutaciones, en un estudio reciente determinamos que las mutaciones L136F y V202F provocan una disminución de la afinidad de TgAT hacia ORY. Por su parte, las mutaciones T239I y V252L provocan una disminución en la flexibilidad de la TgAT, lo que conduce a un aumento de resistencia, mientras que R243S también disminuye la flexibilidad de la TgAT pero por la eliminación de un puente salino intramolecular.<sup>80</sup>

### *VII.2.2. Modo de unión de ORY en los diferentes modelos de $\alpha$ -tubulina*

Para poder conocer las diferencias estructurales en la  $\alpha$ -tubulina que pueden afectar la afinidad de ORY, se llevaron a cabo acoplamiento molecular de este compuesto en la  $\alpha$ -tubulina de los organismos susceptibles y no susceptibles estudiados en el alineamiento de secuencias.

En general, el acoplamiento molecular mostró que ORY se une de manera muy similar en los cuatro organismos, disponiendo el sustituyente de dipropilamina hacia la cavidad hidrofóbica, el grupo aromático paralelo a F255 y la sulfonamida hacia la región hidrofílica (entrada al sitio).<sup>8</sup>

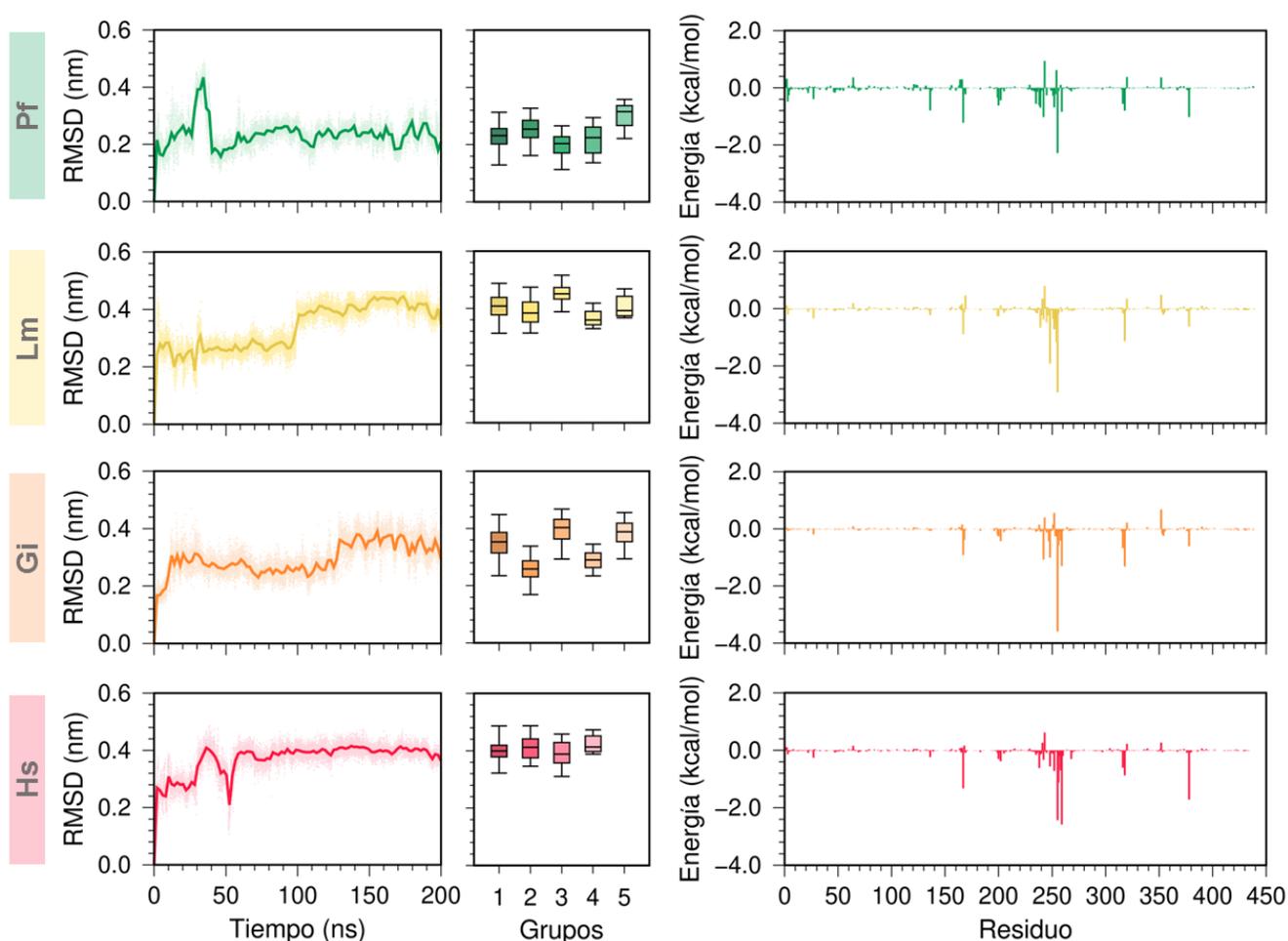
Respecto a la dipropilamina, el resultado del acoplamiento molecular muestra interacciones de tipo hidrofóbicas con los residuos L136, L/I238, T239 y V/L252. El anillo aromático forma una interacción de tipo apilamiento  $\pi$ - $\pi$  con la F255 en los sistemas de GiAT y HsAT, mientras que el residuo de S241 forma un puente de hidrógeno con la sulfonamida. Por su parte, el valor de puntuación (*score*) del acoplamiento no muestra una clara preferencia por alguno de los sistemas, así como tampoco permite explicar diferencias en la afinidad entre organismos.



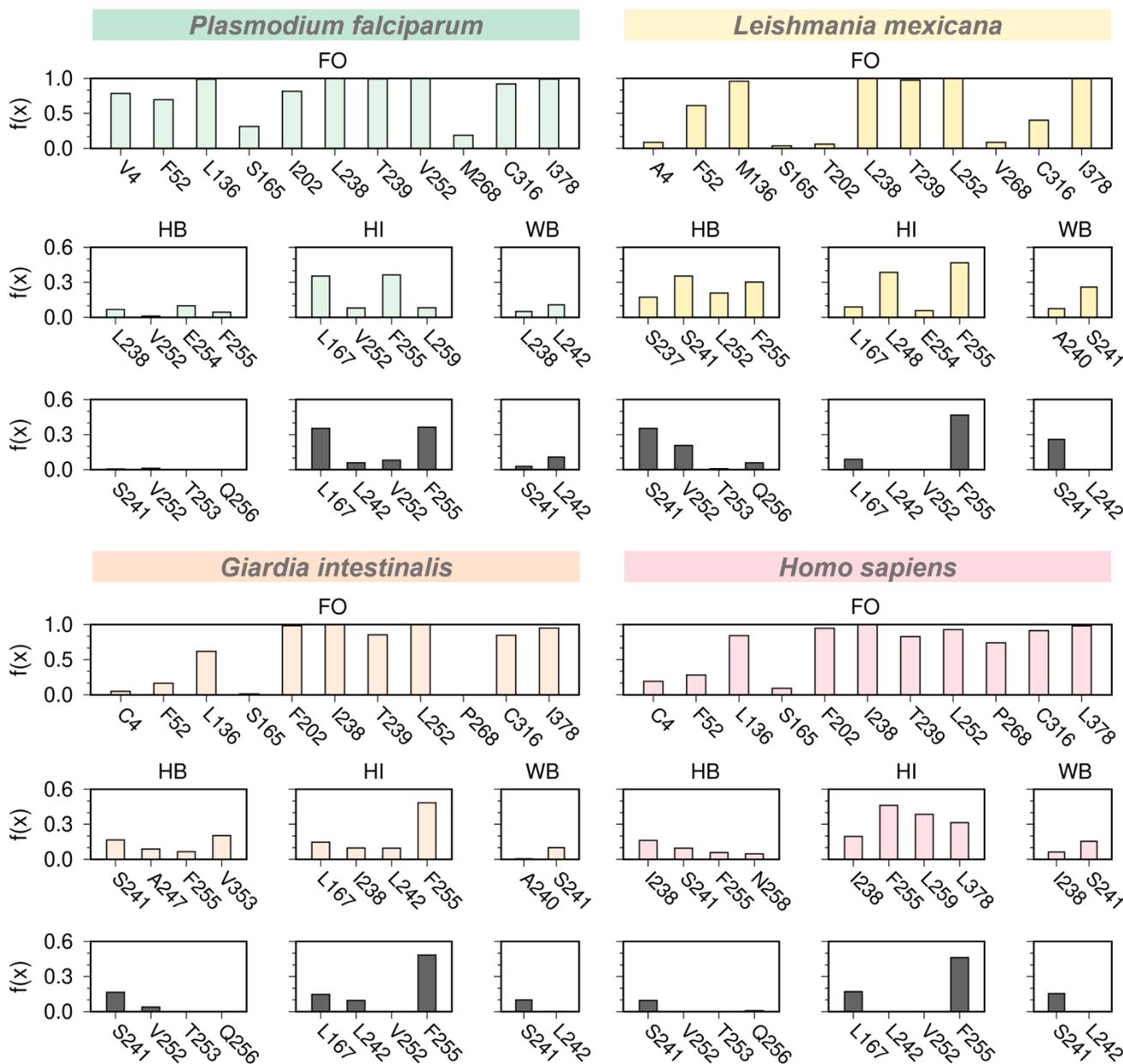
**Figura 7.7.** Resultados del acoplamiento molecular de ORY en el sitio de la pironetina de  $\alpha$ -tubulina de distintos organismos. En cada figura se muestra el perfil de interacción de ORY en la  $\alpha$ -tubulina de *P. falciparum* (verde), *L. mexicana* (amarillo), *G. intestinalis* (naranja) y *H. sapiens* (rosa). Con líneas punteadas se representan las interacciones hidrofóbicas (negro), puente de hidrógeno (azul) y apilamiento  $\pi$ - $\pi$  (verde). Al pie de las figuras se reporta la puntuación (score) y eficiencia de ligando (E.L.) obtenidas en el acoplamiento molecular.

Debido a que el resultado del acoplamiento fue similar entre los cuatro modelos, se decidió estudiar el comportamiento dinámico de los complejos con el fin de detectar pequeñas diferencias entre sistemas que puedan explicar las variaciones en la susceptibilidad. En la

Figura 7.8, se muestra el análisis de 200 ns de simulación realizados a los complejos de ORY con los cuatro sistemas. En general, se observa que ORY fue estable en todos los modelos simulados y que las pequeñas variaciones respecto a la posición original son muy similares a las observadas con TgAT. En el caso del modelo PfAT, hay una variación a los 20 ns que se explica con un giro de 90° que sufre la molécula durante la simulación, pero que se corrige a los 40 ns. Por su parte, los sistemas restantes muestran cambios conformacionales similares a los observados en las simulaciones de TgAT, lo cual se ve reflejado en el análisis de grupos por RMSD donde las agrupaciones espaciales de ORY en el tiempo son similares. Asimismo, el análisis de contribución energética mostró que los residuos que contribuyen a la interacción con ORY en TgAT son los mismos en PfAT, LmAT, GiAT y HsAT.



**Figura 7.8.** Dinámica molecular de ORY en PfAT, LmAT, GiAT y HsAT. (Izquierda) Diagrama de la desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés), (Centro) RMSD de análisis grupos y (Derecha) contribuciones energéticas por residuo.



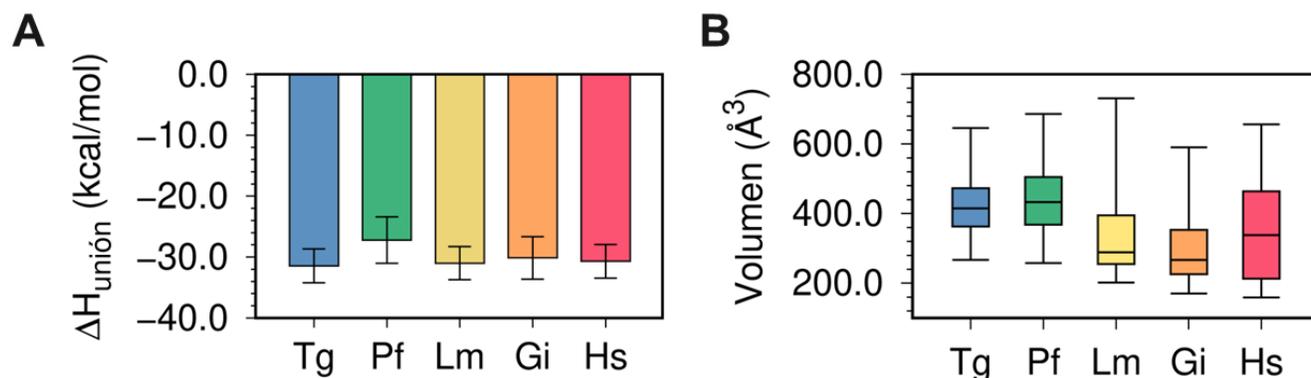
**Figura 7.9.** Perfil de interacción de ORY en el sitio de PfAT (verde), LmAT (amarillo), GiAT (naranja) y HsAT (rosa). Los gráficos muestran el factor de ocupación (FO) de contactos e interacciones de puente de hidrógeno (HB), hidrofóbicas (HI) y puentes de agua (WB) de ORY en los cuatro sistemas.

A pesar de la similitud en el comportamiento dinámico del ligando en los diferentes modelos de  $\alpha$ -tubulina, el análisis de contactos muestra variaciones importantes entre los sistemas (Figura 7.9). Por ejemplo, hay una reducción en el número de contactos con el residuo en la posición 4 en LmAT, GiAT y HsAT debido al cambio de la valina por residuos más pequeños. En el caso del residuo F52, se identificaron un mayor número de contactos en los modelos de organismos susceptibles que en los no susceptibles, lo cual podría estar relacionado con el

nivel de internalización del ligando en el sitio. Esto último se debe a que el aumento en el tamaño del residuo en la posición 202 podría impedir que ORY ingrese a la región de la cavidad hidrofóbica, que es donde se encuentra F52. De nueva cuenta, se encontró que F255 cumple un papel importante en la unión de ORY a la tubulina, dado que presenta interacciones de puente de hidrógeno e hidrofóbicas en los cuatro sistemas estudiados. De forma similar, S241 podría estar cumpliendo un papel importante en la interacción, tanto por la formación de puentes de hidrógeno con la sulfonamida como con la formación de puentes de agua.

Dada la similitud en la estabilidad, contribuciones energéticas y perfil de interacción de ORY en los cuatro sistemas estudiados, se decidió calcular la entalpía de unión en busca de posibles diferencias entre los organismos (*Figura 7.10A*). Sin embargo, se obtuvo un resultado similar en todos ellos, con un valor promedio de  $-30.0$  kcal/mol. Esto último sugiere que no existe selectividad termodinámica de ORY por las  $\alpha$ -tubulina de organismos susceptibles y no susceptibles. Por lo que la explicación de las variaciones en la susceptibilidad al tratamiento con este compuesto podría no estar relacionadas directamente con la afinidad sino con su tiempo de residencia o mecanismo de ingreso.

Algo que es importante resaltar de estas simulaciones, y que contribuirían a la hipótesis de que el mecanismo de ingreso sería el paso limitante entre los sistemas, es que el volumen de la cavidad disminuyó significativamente en el caso de LmAT, GiAT y HsAT. Este resultado podría explicarse por la presencia del residuo F202, el cual reduce el volumen de la cavidad e impide la completa internalización de ORY en el sitio, como se mencionó anteriormente.



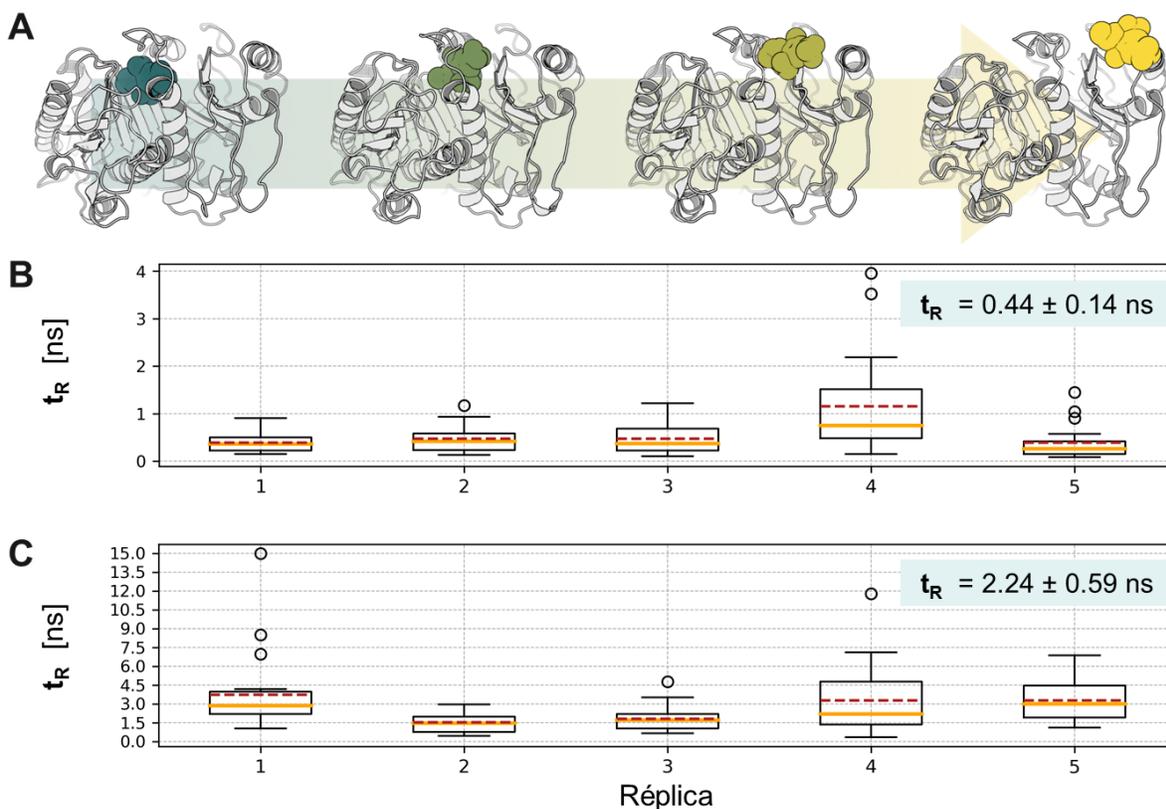
**Figura 7.10.** (A) Entalpía de unión de ORY en la  $\alpha$ -tubulina de distintos organismos, *Toxoplasma gondii* (Tg), *Plasmodium falciparum* (Pf), *Leishmania mexicana* (Lm), *Giardia intestinalis* (Gi) y *Homo sapiens* (Hs). (B) Variación del volumen del sitio de la pironetina en 200 ns de simulación de dinámica molecular.

Las cajas muestran un intervalo de variación de un mínimo a un máximo, usando el primer (15.0 %), segundo (50.0 %) y tercer (85.0 %) cuantiles.

### VII.3. Tiempo de residencia de ORY en TgAT y HsAT

Los resultados de entalpía de unión sugirieron que ORY podría no presentar selectividad termodinámica hacia la  $\alpha$ -tubulina de los diferentes organismos. Por esta razón, es importante considerar la posibilidad de que la susceptibilidad al tratamiento con este compuesto pueda deberse a una selectividad cinética.<sup>81</sup> Es decir, que el proceso de asociación y disociación del ligando podrían estar directamente relacionados a la susceptibilidad de los organismos.

Para demostrar esto, en el presente trabajo se implementó el método de dinámica molecular de aceleración aleatoria  $\tau$  ( $\tau$ RAMD), la cual permite calcular el tiempo de residencia de ligandos en macromoléculas. La importancia de esta técnica computacional radica en poder analizar la estabilidad de una molécula en un sitio establecido y, por medio de una fuerza de magnitud definida, extraerla del sitio con direcciones aleatorias a lo largo del tiempo. La información obtenida permite obtener una aproximación a la constante cinética de disociación ( $k_{off}$ ) a través de la estimación del tiempo de residencia ( $t_R$ ) del ligando en el sitio.



**Figura 7.11.** Distribuciones de tiempo de Residencia de ORY. (A) Representación esquemática del proceso de disociación de ORY del sitio de la pironetina en la  $\alpha$ -tubulina. Tiempos de residencia ( $t_R$ ) de

(B) *T. gondii* y (C) *H. sapiens* obtenidos a partir de 5 réplicas independientes, cada una de las cuales consta de 20 simulaciones de tRAMD.

Para este proyecto, se calculó el  $t_R$  de ORY en las proteínas de  $\alpha$ -tubulina de *T. gondii* (organismo susceptible) y *H. sapiens* (organismo resistente). Al aplicar una fuerza media de 9.56 kcal/mol Å, determinamos que ORY presenta un mayor tiempo de residencia en HsAT ( $t_R = 2.24$  ns) que en TgAT ( $t_R = 0.44$  ns). Estos datos resultarían contrarios a lo visto experimentalmente, puesto que el humano no es susceptible al tratamiento con ORY. Sin embargo, el extenso tiempo de residencia en HsAT se podría deber a la reducción de la cavidad, lo que impide que el ligando se desplace eficientemente del sitio. Por lo tanto, el efecto de susceptibilidad podría estar relacionada a la constante de asociación ( $k_{on}$ ) en lugar de con la  $k_{off}$ , tal como se propuso en la sección anterior. Es decir, la internalización del ligando al sitio se podría ver obstaculizada por las dimensiones de la cavidad y/o por la baja probabilidad de exposición de un sitio más hidrofóbico. Por lo tanto, será importante en un futuro determinar el proceso de asociación para establecer si este es la causa de las variaciones de susceptibilidad entre organismos y demostrar que ORY presentaría una selectividad cinética a las diferentes  $\alpha$ -tubulinas.

### VIII. CONCLUSIONES

El uso de herramientas computacionales permitió llevar a cabo el alineamiento de secuencias, construcción de estructuras terciarias empleando modelado por homología de las distintas  $\alpha$ -tubulinas, la preparación de los derivados de dinitroanilina, el acoplamiento molecular de los ligandos en el sitio de la pironetina y los estudios de dinámica molecular que permitieron identificar el perfil de interacción proteína-ligando.

El análisis de las distintas dinámicas de ORY y derivados con TgAT sugiere que el sustituyente fenilo en la sulfonamida de la GB-II-5 favorece la interacción con el sitio propuesto. Por su parte, la homologación de las cadenas alifáticas del sustituyente de dipropilamina permite conservar interacciones importantes con el sitio hidrofóbico. Sin embargo, el aumento en los grados de libertad (entropía conformacional) provoca un mayor movimiento dentro de la cavidad lo cual conlleva a la reducción de su estabilidad.

El análisis de interacción de ORY con las  $\alpha$ -tubulinas de organismos susceptibles y no susceptibles indicó que en todos los sistemas ORY es estable en el sitio de la pironetina, interactúa con los mismos residuos, y no muestra una selectividad termodinámica entre ellos.

El estudio cinético con  $\tau$ RAMD reveló que ORY presenta un mayor tiempo de residencia en HsAT que en TgAT, lo que sugiere que el mecanismo de susceptibilidad podría estar relacionado con la cinética de asociación ( $k_{on}$ ) y no con la de disociación ( $k_{off}$ ) ni con el componente termodinámico ( $\Delta H_{unión}$ ).

## **IX. PERSPECTIVAS**

Realizar simulaciones de Dinámica molecular con la  $\alpha$ -tubulinas de otros protozoarios parásitos de interés clínico y proponer nuevas modificaciones a la estructura de ORY. Emplear las herramientas computacionales abordadas en este trabajo para determinar la afinidad a las  $\alpha$ -tubulinas de estos nuevos organismos.

Realizar una validación del cálculo de la  $k_{off}$  de un sistema experimental contra uno calculado empleando la metodología de  $\tau$ RAMD.

Buscar y aplicar una nueva metodología computacional para determinar el componente cinético  $k_{on}$  de los sistemas estudios en este trabajo. Esto último permitirá conocer el perfil completo de la selectividad cinética hacia la tubulina.

**X. REFERENCIAS**

- (1) Morrissette, N. Targeting Toxoplasma tubules: Tubulin, microtubules, and associated proteins in a human pathogen. *Eukaryot. Cell* **2015**, *14* (1), 2–12.
- (2) Ma, C.; Tran, J.; Gu, F.; Ochoa, R.; Li, C.; Sept, D.; Werbovetz, K.; Morrissette, N. Dinitroaniline activity in Toxoplasma gondii expressing wild-type or mutant  $\alpha$ -tubulin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (4), 1453–1460.
- (3) Mitra, A.; Sept, D. Binding and interaction of dinitroanilines with apicomplexan and kinetoplastid  $\alpha$ -tubulin. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (17), 5226–5231.
- (4) Arici, M.; Abudayyak, M.; Boran, T.; Özhan, G. Does pendimethalin develop in pancreatic cancer induced inflammation? *Chemosphere* **2020**, *252*, 1–6.
- (5) Nyporko, A. Y.; Yemets, A. I.; Brytsun, V. N.; Lozinsky, M. O.; Blume, Y. B. Structural and biological characterization of the tubulin interaction with dinitroanilines. *Cytol. Genet.* **2009**, *43* (4), 267–282.
- (6) Hashimoto, T. Dissecting the cellular functions of plant microtubules using mutant tubulins. *Cytoskeleton* **2013**, *70* (4), 191–200.
- (7) Hashim, S.; Jan, A.; Sunohara, Y.; Hachinohe, M.; Ohdan, H.; Matsumoto, H. Mutation of alpha-tubulin genes in trifluralin-resistant water foxtail (Alopecurus aequalis). *Pest Manag. Sci.* **2012**, *68* (3), 422–429.
- (8) Chen, J.; Chu, Z.; Han, H.; Goggin, D. E.; Yu, Q.; Sayer, C.; Powles, S. B. A Val-202-Phe  $\alpha$ -tubulin mutation and enhanced metabolism confer dinitroaniline resistance in a single Lolium rigidum population. *Pest Manag. Sci.* **2020**, *76* (2), 645–652.
- (9) Délye, C.; Menchari, Y.; Michel, S.; Darmency, H. Molecular bases for sensitivity to tubulin-binding herbicides in green foxtail. *Plant Physiol.* **2004**, *136* (4), 3920–3932.
- (10) Callahan, H. L.; Kelley, C.; Pereira, T.; Grogl, M. Microtubule inhibitors: Structure-activity analyses suggest rational models to identify potentially active compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40* (4), 947–952.
- (11) Ma, C.; Tran, J.; Gu, F.; Ochoa, R.; Li, C.; Sept, D.; Werbovetz, K.; Morrissette, N. Dinitroaniline activity in Toxoplasma gondii expressing wild-type or mutant  $\alpha$ -tubulin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (4), 1453–1460.
- (12) Fennell, B. J.; Naughton, J. A.; Dempsey, E.; Bell, A. Cellular and molecular actions of dinitroaniline and phosphorothioamidate herbicides on Plasmodium falciparum: Tubulin

- as a specific antimalarial target. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2006**, *145* (2), 226–238.
- (13) Werbovetz, K. A.; Sackett, D. L.; Delfin, D.; Bhattacharya, G.; Salem, M.; Obrzut, T.; Rattendi, D.; Bacchi, C. Selective Antimicrotubule Activity of N1-Phenyl-3,5-dinitro-N4,N4-di-n-propylsulfanilamide (GB-II-5) against Kinetoplastid Parasites. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64* (6), 1325–1333.
- (14) Bhattacharya, G.; Salem, M. M.; Werbovetz, K. A. Antileishmanial dinitroaniline sulfonamides with activity against parasite tubulin. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (17), 2395–2398.
- (15) Chan, M. M. Y.; Fong, D. Inhibition of leishmaniasis but not host macrophages by the antitubulin herbicide trifluralin. *Science* (80-. ). **1990**, *249* (4971), 924–926.
- (16) Traub-Cseko, Y. M.; Ramalho-Ortigão, J. M.; Dantas, A. P.; De Castro, S. L.; Barbosa, H. S.; Downing, K. H. Dinitroaniline herbicides against protozoan parasites: The case of *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol.* **2001**, *17* (3), 136–141.
- (17) Terra, L. L.; Campanati, L.; De Souza, W. Heterogeneity in the sensitivity of microtubules of *Giardia lamblia* to the herbicide oryzalin. *Parasitol. Res.* **2010**, *107* (1), 47–54.
- (18) Makioka, A.; Kumagai, M.; Ohtomo, H.; Kobayashi, S.; Takeuchi, T. Effect of Dinitroaniline Herbicides on the Growth of *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* **2000**, *86* (3), 607.
- (19) Vicente-Blázquez, A.; González, M.; Álvarez, R.; del Mazo, S.; Medarde, M.; Peláez, R. Antitubulin sulfonamides: The successful combination of an established drug class and a multifaceted target. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39* (3), 775–830.
- (20) Sant'anna, V.; de Souza, W.; Vommaro, R. C. Anthelmintic effect of herbicidal dinitroanilines on the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Parasitol.* **2016**, *167*, 43–49.
- (21) Hirst, W. G.; Facht, D.; Kuropka, B.; Weise, C.; Saliba, K. J.; Reber, S. Purification of functional *Plasmodium falciparum* tubulin allows for the identification of parasite-specific microtubule inhibitors. *Curr. Biol.* **2022**, *32*, 1–8.
- (22) Alonso, V. L.; Carloni, M. E.; Gonçalves, C. S.; Martinez Peralta, G.; Chesta, M. E.; Pezza, A.; Tavernelli, L. E.; Motta, M. C. M.; Serra, E. Alpha-Tubulin Acetylation in *Trypanosoma cruzi*: A Dynamic Instability of Microtubules Is Required for Replication and Cell Cycle Progression. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 1.
- (23) Udofia, I. A.; Ogunbayo, T. B.; Oloba-Whenu, O. A.; Isanbor, C.; Ramasami, P. Investigation of the reactivity indices for the formation of substituted dinitroanilines and

- correlations to their dockings on  $\alpha$ -tubulin of *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Model.* **2019**, 25 (11).
- (24) Giles, N. L.; Armson, A.; Reid, S. A. Characterization of trifluralin binding with recombinant tubulin from *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Res.* **2009**, 104 (4), 893–903.
- (25) HERNÁNDEZ-CORTAZAR, I.; ACOSTA-VIANA, K. Y.; ORTEGA-PACHECO, A.; GUZMAN-MARIN, E. del S.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; JIMÉNEZ-COELLO, M. Toxoplasmosis in Mexico: Epidemiological Situation in Humans and Animals. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2015**, 57 (2), 93–103.
- (26) Stokkermans, T. J. W.; Schwartzman, J. D.; Keenan, K.; Morrissette, N. S.; Tilney, L. G.; Roos, D. S. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. *Exp. Parasitol.* **1996**, 84 (3), 355–370.
- (27) Morrissette, N. Targeting *Toxoplasma* tubules: Tubulin, microtubules, and associated proteins in a human pathogen. *Eukaryot. Cell* **2015**, 14 (1), 2–12.
- (28) Romero Cabello, R.; Romero Feregrino, R.; Romero Feregrino, R. Parasitología. In *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*; Editorial Médica Panamericana: Ciudad de México, 2018; pp 947–1069.
- (29) Dempsey, E.; Prudêncio, M.; Fennell, B. J.; Gomes-Santos, C. S.; Barlow, J. W.; Bell, A. Antimitotic herbicides bind to an unidentified site on malarial parasite tubulin and block development of liver-stage *Plasmodium* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2013**, 188 (2), 116–127.
- (30) Histórico Boletín Epidemiológico <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico> (accessed Sep 12, 2022).
- (31) Chan, M. M. Y.; Triemer, R. E.; Fong, D. Effect of the anti-microtubule drug oryzalin on growth and differentiation of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*. *Differentiation* **1991**, 46 (1), 15–21.
- (32) Alonso, V. L.; Carloni, M. E.; Gonçalves, C. S.; Martinez, G.; Chesta, M. E.; Pezza, A.; Tavernelli, L. E.; Cristina, M.; Motta, M.; Serra, E. Alpha-tubulin acetylation in *Trypanosoma cruzi*: a dynamic instability of microtubules is required for replication and cell cycle progression. *bioRxiv* **2020**.
- (33) Cabrera-Licona, A.; Arguello-García, R.; Pierres-Pierres, M. G. Giardiasis <https://www.asieslamedicina.org.mx/giardiasis/#:~:text=En México%2C la prevalencia de,clínica en este país39.> (accessed Sep 12, 2022).

- (34) Werner Apt, B. Infecciones por parásitos más frecuentes y su manejo. *Rev. Médica Clínica Las Condes* **2014**, 25 (3), 485–528.
- (35) Anthony, R. G.; Hussey, P. J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton. *Trends Plant Sci.* **1999**, 4 (3), 112–116.
- (36) Morrissette, N. S.; Mitra, A.; Sept, D.; Sibley, L. D. Dinitroanilines Bind  $\alpha$ -Tubulin to Disrupt Microtubules. *Mol. Biol. Cell* **2004**, 15 (4), 1960–1968.
- (37) Steinmetz, M. O.; Protá, A. E. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **2018**, 28 (10), 776–792.
- (38) Pham, C. L.; Morrissette, N. S. The tubulin mutation database: A resource for the cytoskeleton community. *Cytoskeleton* **2019**, 76 (2), 186–191.
- (39) Morrissette, N. S.; Sept, D. Dinitroaniline interactions with tubulin: genetic and computational approaches to define the mechanisms of action and resistance. In *The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology*; Blume, Y. b., Baird, W. V., Yemets, A. I., Breviario, D., Eds.; Springer, 2008; pp 327–349.
- (40) Ma, C.; Li, C.; Ganesan, L.; Oak, J.; Tsai, S.; Sept, D.; Morrissette, N. S. Mutations in  $\alpha$ -Tubulin Confer Dinitroaniline Resistance at a Cost to Microtubule Function. *Mol. Biol. Cell* **2007**, 18 (12), 4711–4720.
- (41) Kato-Minoura, T.; Ogiwara, Y.; Yamano, T.; Fukuzawa, H.; Kamiya, R. Chlamydomonas reinhardtii tubulin-gene disruptants for efficient isolation of strains bearing tubulin mutations. *PLoS One* **2020**, 15 (11 November), 1–17.
- (42) Ma, C.; Tran, J.; Li, C.; Ganesan, L.; Wood, D.; Morrissette, N. Secondary mutations correct fitness defects in Toxoplasma gondii with dinitroaniline resistance mutations. *Genetics* **2008**, 180 (2), 845–856.
- (43) Lyons-Abbott, S.; Sackett, D. L.; Wloga, D.; Gaertig, J.; Morgan, R. E.; Werbovets, K. A.; Morrissette, N. S.  $\alpha$ -Tubulin Mutations Alter Oryzalin Affinity and Microtubule Assembly Properties To Confer Dinitroaniline Resistance. *Eukaryot. Cell* **2010**, 9 (12), 1825–1834.
- (44) Blume, Y. B.; Nyporko, A. Y.; Yemets, A. I.; Baird, W. V. Structural modeling of the interaction of plant  $\alpha$ -tubulin with dinitroaniline and phosphoramidate herbicides. *Cell Biol. Int.* **2003**, 27 (3), 171–174.
- (45) Chu, Z.; Chen, J.; Nyporko, A.; Han, H.; Yu, Q.; Powles, S. Novel  $\alpha$ -tubulin mutations conferring resistance to dinitroaniline herbicides in Lolium rigidum. *Front. Plant Sci.* **2018**, 9 (February), 1–12.
- (46) Ozheredov, S. P.; Demchuk, O. M.; Karpov, P. A.; Spivak, S. I.; Blume, Y. B. Identification

- of plant  $\alpha$ -tubulin amino acids playing a key role in specific binding of nitroaniline compounds. *Fakt. Eksp. Evol. Org.* **2019**, *24*, 333–337.
- (47) Assis, T. M.; Mancini, D. T.; Ramalho, T. C.; da Cunha, E. F. F. In Silico Study of Leishmania donovani  $\alpha$  -  $\beta$  Tubulin and Inhibitors. *J. Chem.* **2014**, *2014*, 1–8.
- (48) Aguayo-Ortiz, R.; Dominguez, L. Unveiling the Possible Oryzalin-Binding Site in the  $\alpha$ -Tubulin of Toxoplasma gondii . *ACS Omega* **2022**, *7* (22), 18434–18442.
- (49) ChemAxon. Marvin was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures, substructures and reactions. p Marvin version 21.17.0.
- (50) Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.* **2012**, *4* (1), 17.
- (51) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J Comput Chem* **2004**, *25*, 1157–1174.
- (52) Goldstein, A. A. On Steepest Descent. *J. Soc. Ind. Appl. Math. Ser. A Control* **1965**, *3* (1), 147–151.
- (53) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37* (2), 785–789.
- (54) Alex D. Beck. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7), 5648–5656.
- (55) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Had, and D. J. F. Gaussian 09 (Gaussian, Inc., Wallingford CT). 2009.
- (56) Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4:Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *32* (16), 2785–2791.
- (57) Gasteiger, J.; Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **1980**, *36* (22), 3219–3228.
- (58) Meagher, K. L.; Redman, L. T.; Carlson, H. A. Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24* (9), 1016–1025.
- (59) Sousa da Silva, A. W.; Vranken, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Res. Notes* **2012**, *5* (1), 367.
- (60) Jakalian, A.; Jack, D. B.; Bayly, C. I. Fast, efficient generation of high-quality atomic

- charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *J. Comput. Chem.* **2002**, 23 (16), 1623–1641.
- (61) Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, 26 (16), 1668–1688.
- (62) Leinonen, R.; Garcia Diez, F.; Binns, D.; Fleischmann, W.; Lopez, R.; Apweiler, R. UniProt archive. *Bioinformatics* **2004**, 20 (17), 3236–3237.
- (63) Bairoch, A.; Boeckmann, B.; Ferro, S.; Gasteiger, E. Swiss-Prot: juggling between evolution and stability. *Brief. Bioinform.* **2004**, 5 (1), 39–55.
- (64) Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; De Beer, T. A. P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, 46 (W1), W296–W303.
- (65) Yang, J.; Wang, Y.; Wang, T.; Jiang, J.; Botting, C. H.; Liu, H.; Chen, Q.; Yang, J.; Naismith, J. H.; Zhu, X.; et al. Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of  $\alpha$ -tubulin to destabilize microtubule. *Nat. Commun.* **2016**, 7 (May), 1–9.
- (66) Pham, C. L.; Morrissette, N. S. The tubulin mutation database: A resource for the cytoskeleton community. *Cytoskeleton* **2019**, 76 (2), 186–191.
- (67) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25 (13), 1605–1612.
- (68) Trott, Oleg and Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31 (2), 455–461.
- (69) Lindorff-Larsen, K.; Piana, S.; Palmo, K.; Maragakis, P.; Klepeis, J. L.; Dror, R. O.; Shaw, D. E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2010**, 78 (8), 1950–1958.
- (70) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindah, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **2015**, 1–2, 19–25.
- (71) Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, 126 (1), 014101.
- (72) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R.

- Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81* (8), 3684–3690.
- (73) Gowers, R.; Linke, M.; Barnoud, J.; Reddy, T.; Melo, M.; Seyler, S.; Domański, J.; Dotson, D.; Buchoux, S.; Kenney, I.; et al. MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations. In *Proceedings of the 15th Python in Science Conference*; 2016; pp 98–105.
- (74) Kumari, R.; Kumar, R.; Lynn, A. G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54* (7), 1951–1962.
- (75) Salentin, S.; Schreiber, S.; Haupt, V. J.; Adasme, M. F.; Schroeder, M. PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (W1), W443–W447.
- (76) Wagner, J. R.; Sørensen, J.; Hensley, N.; Wong, C.; Zhu, C.; Perison, T.; Amaro, R. E. POVME 3.0: Software for Mapping Binding Pocket Flexibility. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13* (9), 4584–4592.
- (77) Musil, D.; Buchstaller, H.; Dreyer, M. K.; Frech, M.; Lowinski, M.; Vallee, F.; Bianciotto, M.; Rak, A.; Wade, R. C. Estimation of Drug-Target Residence Times by  $\tau$  - Random Acceleration Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **2018**, *14*, 3859–3869.
- (78) Parrinello, M.; Rahman, A. Strain fluctuations and elastic constants. *J. Chem. Phys.* **1982**, *76* (5), 2662–2666.
- (79) Braga, C.; Travis, K. P. A configurational temperature Nosé-Hoover thermostat. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123* (13), 0–15.
- (80) Flores-León, C. D.; Dominguez, L.; Aguayo-Ortiz, R. Molecular basis of *Toxoplasma gondii* oryzalin resistance from a novel  $\alpha$ -tubulin binding site model. *Arch. Biochem. Biophys.* **2022**, *730* (September).
- (81) Tonge, P. J. Drug-Target Kinetics in Drug Discovery. **2017**.
- (82) Wang, Y.; Zhang, H.; Gigant, B.; Yu, Y.; Wu, Y.; Chen, X.; Lai, Q.; Yang, Z.; Chen, Q.; Yang, J. Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. *FEBS J.* **2016**, *283* (1), 102–111.

## ANEXO

Tabla 11.1. Clave interna, nombre y código SMILES de los análogos de la dinitroanilina

Clave	Nombre	SMILES
ORY	Orizalina	<chem>CCCN(CCC)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)S(N)(=O)=O)[N+](O)=O</chem>
CLN	Cloralina	<chem>[O-][N+](=O)C1=CC(=CC(=C1Cl)[N+](O)=O)C(F)(F)F</chem>
TFL	Trifluralina	<chem>CCCN(CCC)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)C(F)(F)F)[N+](O)=O</chem>
DNT-1	IAU1	<chem>CCCN(CCC)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)C(=O)OC)[N+](O)=O</chem>
DNT-2	IAU2	<chem>CCCN(CCC)C1=C(C=C(NC(=O)OC)C=C1[N+](O)=O)[N+](O)=O</chem>
DNT-3	IAU3	<chem>CCCN(CCC)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)S(O)(=O)=O)[N+](O)=O</chem>
DNT-4	Benfluralina	<chem>CCCCN(CC)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)C(F)(F)F)[N+](O)=O</chem>
DNT-5	Butralina	<chem>CCC(C)NC1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)C(C)(C)C)[N+](O)=O</chem>
DNT-6	CLN Análogo 1	<chem>[O-][N+](=O)C1=CC(=CC(=C1Cl)S(=O)=O)C(F)(F)F</chem>
DNT-7	CLN Análogo 2	<chem>[O-][N+](=O)C1=CC(=CC=C1Cl)C(F)(F)F</chem>
DNT-8	CLN Análogo 3	<chem>[O-][N+](=O)C1=CC(=CC=C1S)C(F)(F)F</chem>
DNT-9	Dinitramina	<chem>CCN(CC)C1=C(C=C(C(N)=C1[N+](O)=O)C(F)(F)F)[N+](O)=O</chem>
DNT-10	Etalfluralina	<chem>CCN(CC(C)=C)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)C(F)(F)F)[N+](O)=O</chem>
DNT-11	Flucloralina	<chem>CCCN(CCCl)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)C(F)(F)F)[N+](O)=O</chem>
DNT-12	GB-II-5	<chem>CCCN(CCC)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)S(=O)(=O)NC1=CC=CC=C1)[N+](O)=O</chem>
DNT-13	GB-II-46	<chem>CCCCN(CCCC)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)S(N)(=O)=O)[N+](O)=O</chem>
DNT-14	Isopropalina	<chem>CCCN(CCC)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)C(C)C)[N+](O)=O</chem>
DNT-15	Nitralina	<chem>CCCN(CCC)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)S(C)(=O)=O)[N+](O)=O</chem>
DNT-16	Nitrofor	<chem>CCN(CC)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)C(F)(F)F)[N+](O)=O</chem>
DNT-17	Pendimetalina	<chem>CCC(CC)NC1=C(C=C(C)C(C)=C1[N+](O)=O)[N+](O)=O</chem>
DNT-18	Profluralina	<chem>CCCN(CC1CC1)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)C(F)(F)F)[N+](O)=O</chem>
DNT-19	TFL Análogo 1	<chem>[O-][N+](=O)C1=CC(=C(N2CCOCC2)C=C1)[N+](O)=O)C(F)(F)F</chem>
DNT-20	TFL Análogo 2	<chem>CN1CCN(CC1)C1=C(C=C(C=C1[N+](O)=O)[N+](O)=O)C(F)(F)F</chem>
DNT-21	TFL Análogo 3	<chem>[O-][N+](=O)C1=CC(=C(N2CCCC2)C=C1)[N+](O)=O)C(F)(F)F</chem>
DNT-22	TFL Análogo 4	<chem>[O-][N+](=O)C1=CC(=C(NCCCN2C=CN=C2)C=C1)[N+](O)=O)C(F)(F)F</chem>

**Tabla 11.2.** Análisis de similitud entre secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ -tubulina del humano

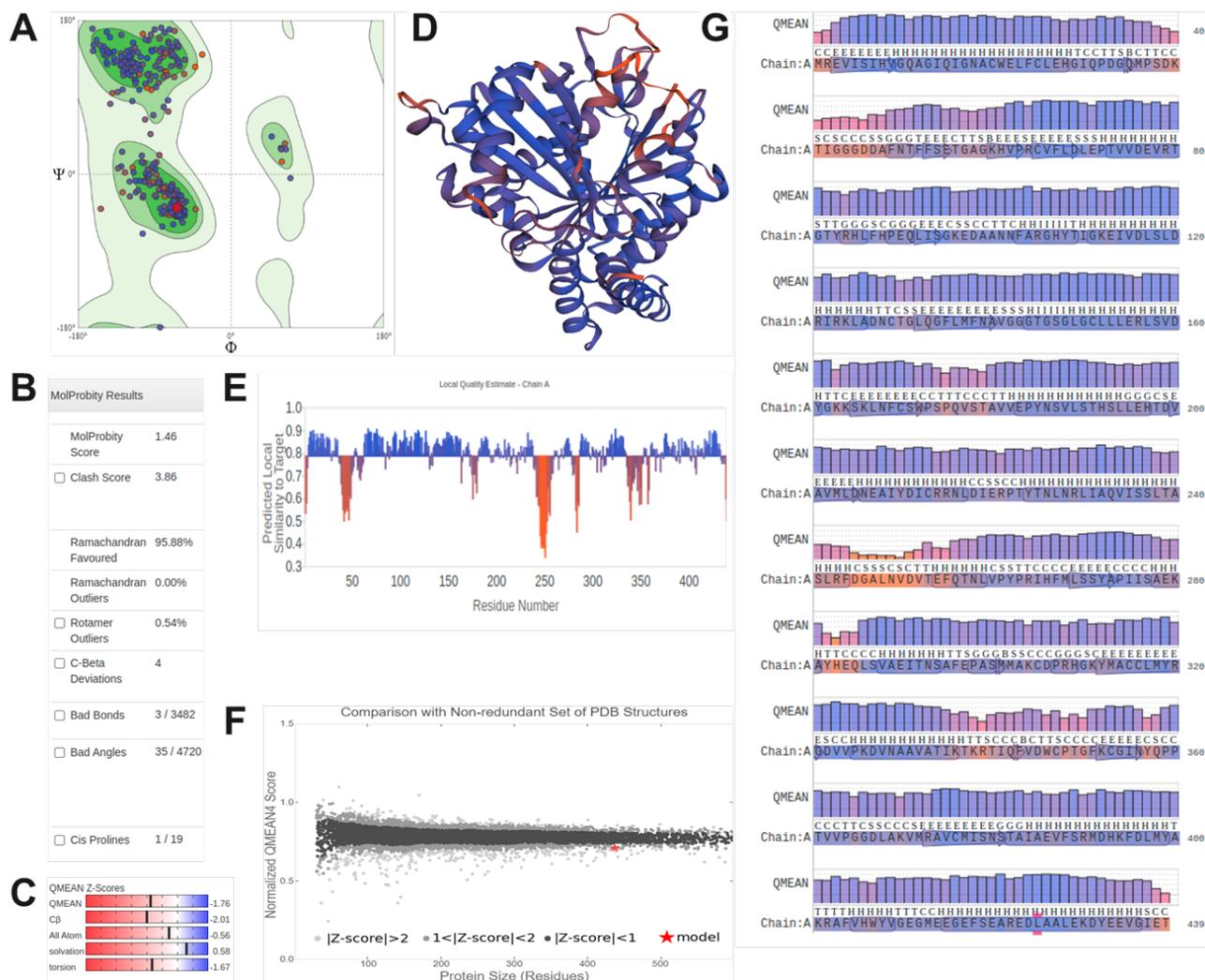
	IA	IB	IC	IIIC	IIIE	IVA	VIII
IA	100	99.56	98	97.56	96.23	95.34	89.8
IB	99.56	100	98	97.12	95.79	95.79	89.8
IC	98	98	100	96.22	94.89	95.99	89.8
IIIC	97.56	97.12	96.22	100	98.67	93.78	90.67
IIIE	96.23	95.79	94.89	98.67	100	92.67	89.11
IVA	95.34	95.79	95.99	93.78	92.67	100	89.8
VIII	89.8	89.8	89.8	90.67	89.11	89.8	100
Promedio	96.08	96.01	95.48	95.67	94.56	93.90	89.83

**Tabla 11.3.** Similitud entre secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ -tubulina del humano con otros organismos

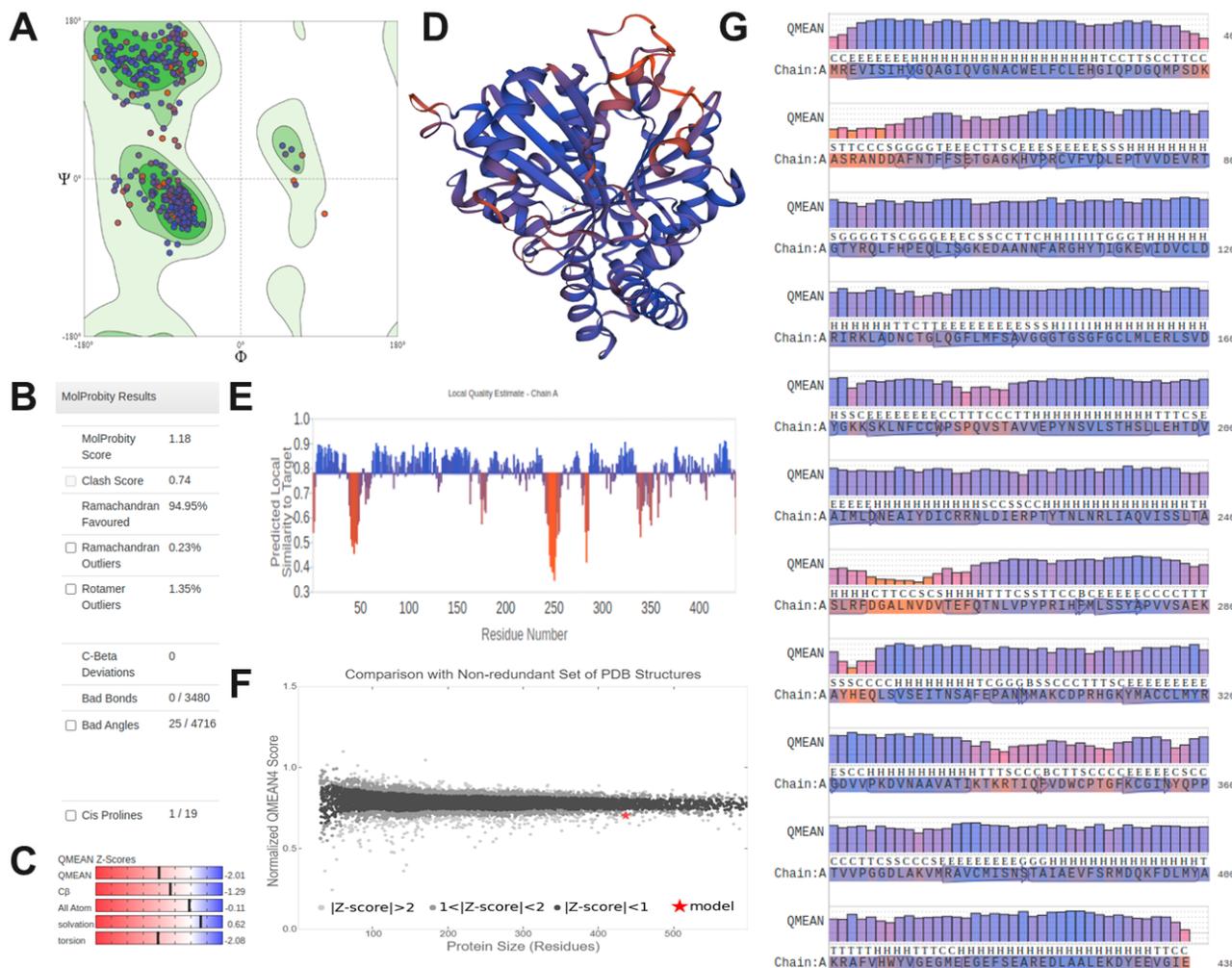
	IA	IB	IC	IIIC	IIIE	IVA	VIII
Tg	84.99	84.77	84.11	85.21	83.66	81.9	79.47
Pf	83.66	83.44	82.56	83	81.9	81.24	78.59
Tb	84.7	84.23	84.23	84.48	83.15	81.15	78.71
Lm	82.48	82.04	81.82	82.27	81.15	79.16	76.72
Lr	84.04	84.04	85.11	83.78	82.67	81.78	77.78
Gi	84.8	84.58	84.18	85.46	84.8	82.82	81.1
Ce	93.13	93.13	91.78	92	90.67	90.67	86.67
Promedio	85.40	85.18	84.83	85.17	84.00	82.67	79.86

**Tabla 11.4.** Análisis de similitud entre secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ -tubulina de organismos

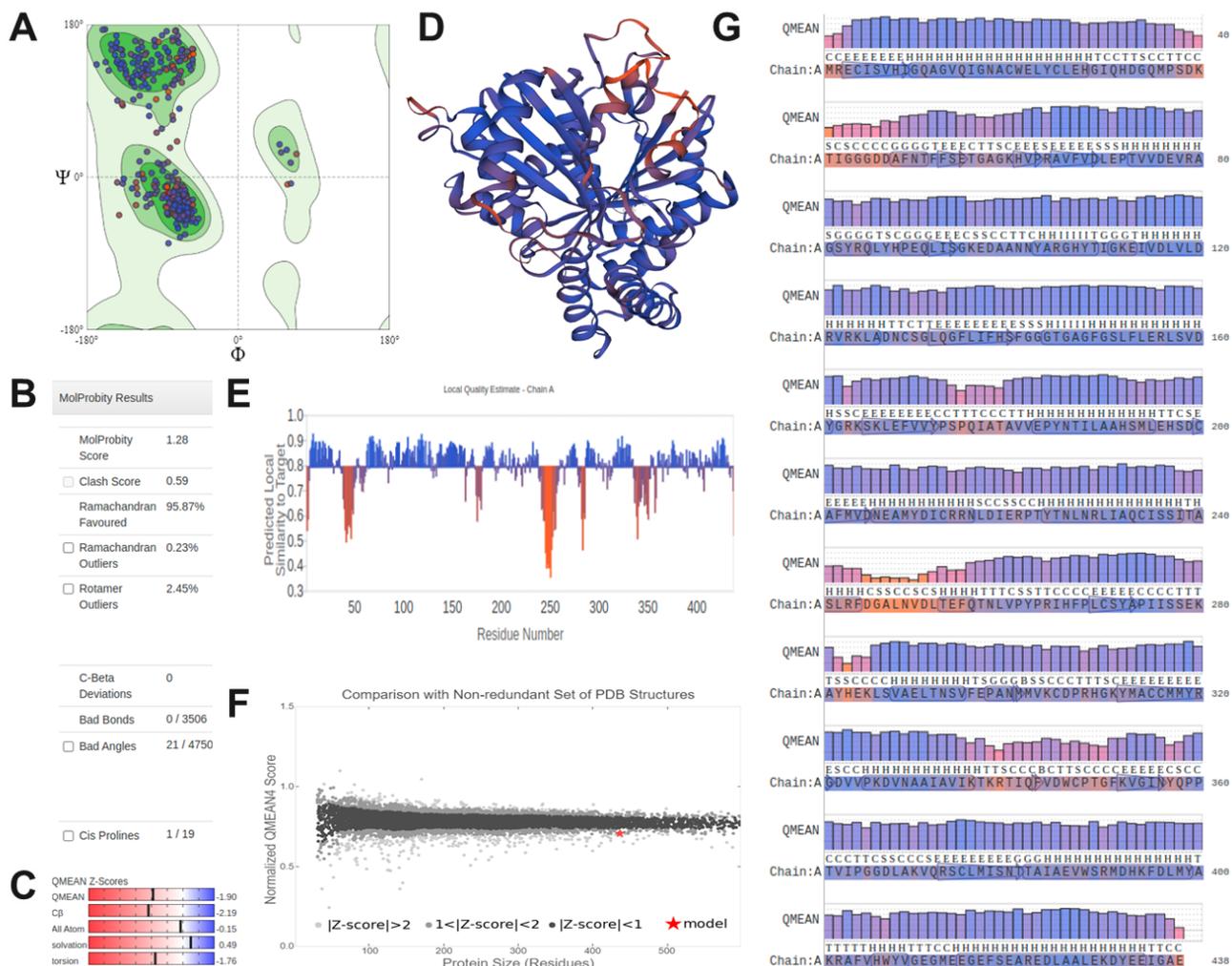
	Tg	Pf	Lm	Gi	HsIA	HsIB	HsIC	HsIIIC	HsIIIE	HsIVA	HsVIII
Tg	100	93.6	86.76	83.7	84.99	84.77	84.11	85.21	83.66	81.9	79.47
Pf	93.6	100	84.99	81.28	83.66	83.44	82.56	83	81.9	81.24	78.59
Lm	86.76	84.99	100	79.74	82.48	82.04	81.82	82.27	81.15	79.16	76.72
Gi	83.7	81.28	79.74	100	84.8	84.58	84.18	85.46	84.8	82.82	81.1
HsIA	84.99	83.66	82.48	84.8	100	99.56	98	97.56	96.23	95.34	89.8
HsIB	84.77	83.44	82.04	84.58	99.56	100	98	97.12	95.79	95.79	89.8
HsIC	84.11	82.56	81.82	84.18	98	98	100	96.22	94.89	95.99	89.8
HsIIIC	85.21	83	82.27	85.46	97.56	97.12	96.22	100	98.67	93.78	90.67
HsIIIE	83.66	81.9	81.15	84.8	96.23	95.79	94.89	98.67	100	92.67	89.11
HsIVA	81.9	81.24	79.16	82.82	95.34	95.79	95.99	93.78	92.67	100	89.8
HsVIII	79.47	78.59	76.72	81.1	89.8	89.8	89.8	90.67	89.11	89.8	100



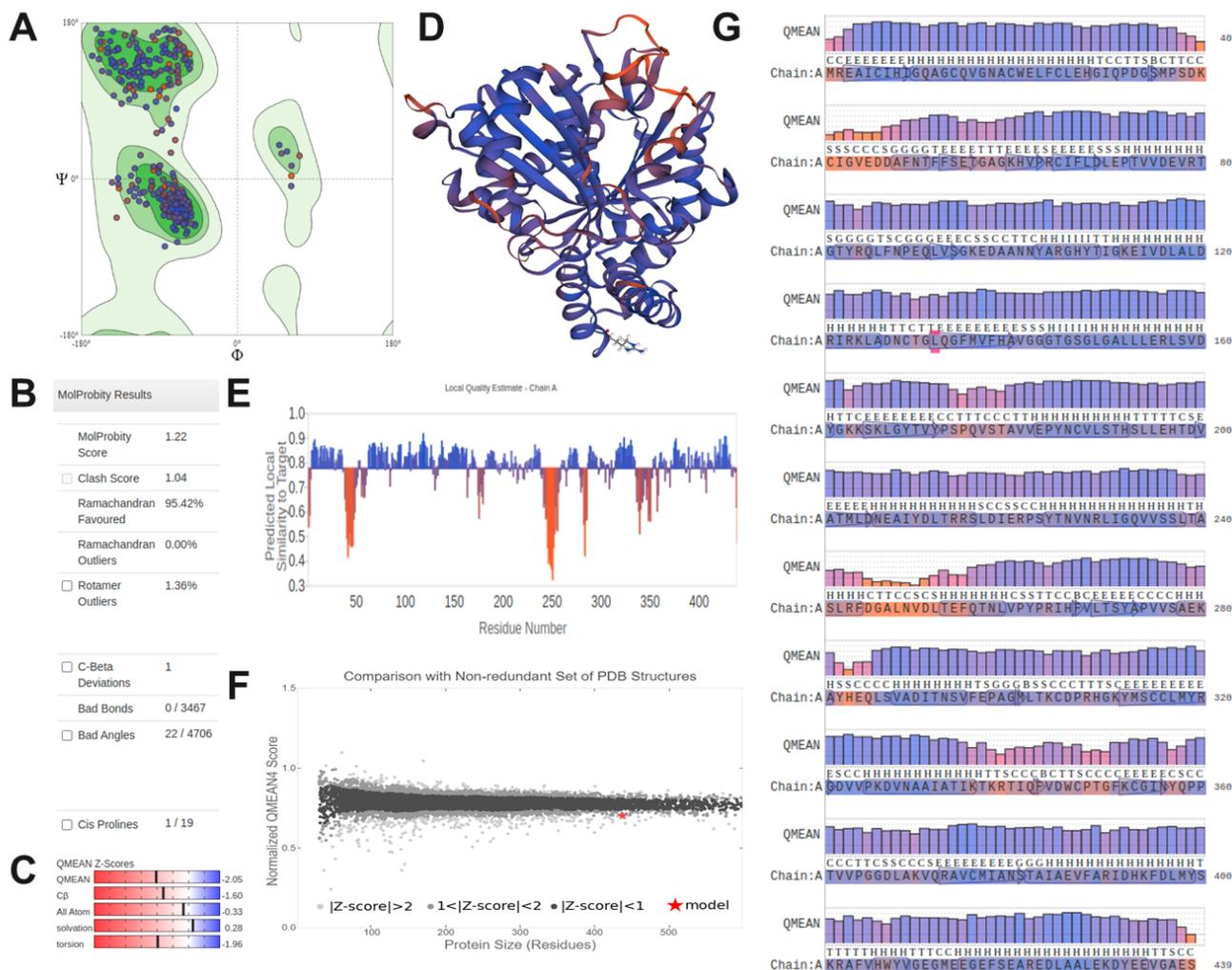
**Figura 11.1.** Evaluación de la estructura de la  $\alpha$ -tubulina de *Toxoplasma gondii* (TgAT) generado por Swiss-Model<sup>64</sup> usando el PDB: 5ca1 (cadena C)<sup>82</sup> como molde. (A) Gráfico de Ramachandran, (B) resultados de MolProbity, (C) puntajes QMEAN4, (D) estructura tridimensional coloreada por la confianza del modelo, (E) similitud local respecto al molde, (F) puntuación normalizada de QMEAN4 y (G) calidad de los residuos coloreados por su valor local de calidad.



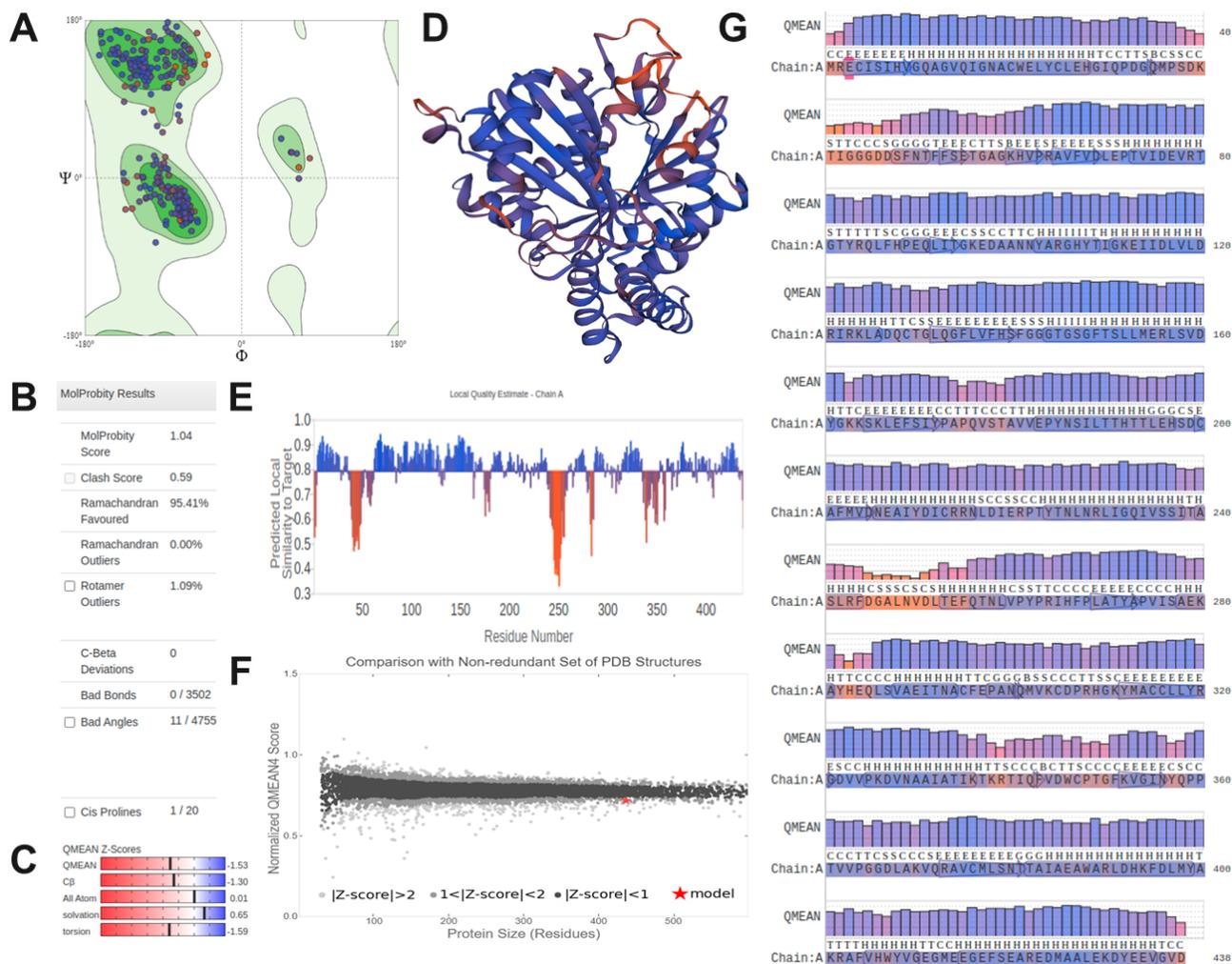
**Figura 11.2.** Evaluación de la estructura de la  $\alpha$ -tubulina de *Plasmodium falciparum* (PfAT) generado por Swiss-Model<sup>64</sup> usando el PDB: 5ca1 (cadena C)<sup>82</sup> como molde. (A) Gráfico de Ramachandran, (B) resultados de MolProbity, (C) puntajes QMEAN4, (D) estructura tridimensional coloreada por la confianza del modelo, (E) similitud local respecto al molde, (F) puntuación normalizada de QMEAN4 y (G) calidad de los residuos coloreados por su valor local de calidad.



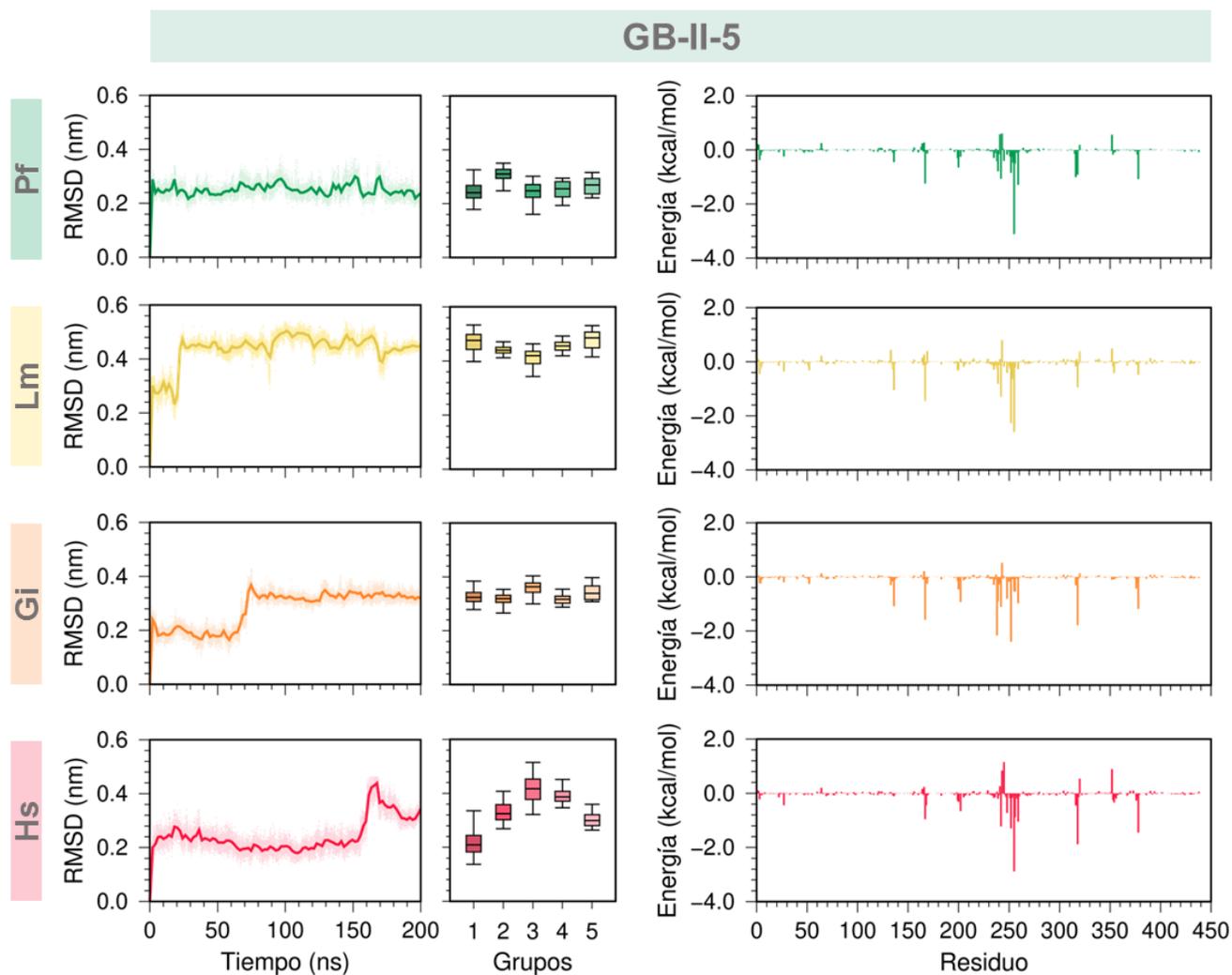
**Figura 11.3.** Evaluación de la estructura de la  $\alpha$ -tubulina de *Leishmania mexicana* (LmAT) generado por Swiss-Model<sup>64</sup> usando el PDB: 5ca1 (cadena C)<sup>82</sup> como molde. (A) Gráfico de Ramachandran, (B) resultados de MolProbity, (C) puntajes QMEAN4, (D) estructura tridimensional coloreada por la confianza del modelo, (E) similitud local respecto al molde, (F) puntuación normalizada de QMEAN4 y (G) calidad de los residuos coloreados por su valor local de calidad.



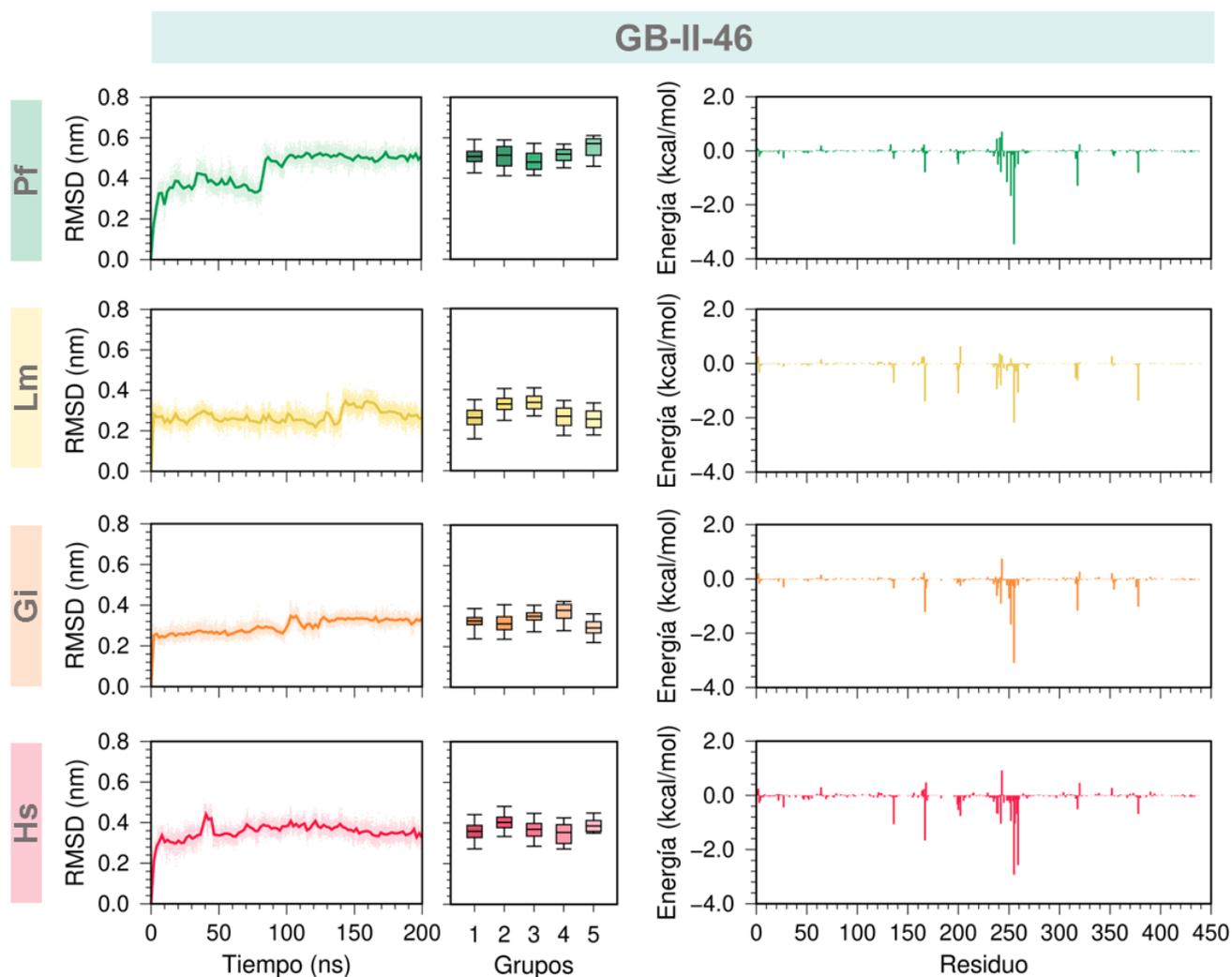
**Figura 11.4.** Evaluación de la estructura de la  $\alpha$ -tubulina de *Giardia intestinalis* (GiAT) generado por Swiss-Model<sup>64</sup> usando el PDB: 5ca1 (cadena C)<sup>82</sup> como molde. (A) Gráfico de Ramachandran, (B) resultados de MolProbity, (C) puntajes QMEAN4, (D) estructura tridimensional coloreada por la confianza del modelo, (E) similitud local respecto al molde, (F) puntuación normalizada de QMEAN4 y (G) calidad de los residuos coloreados por su valor local de calidad.



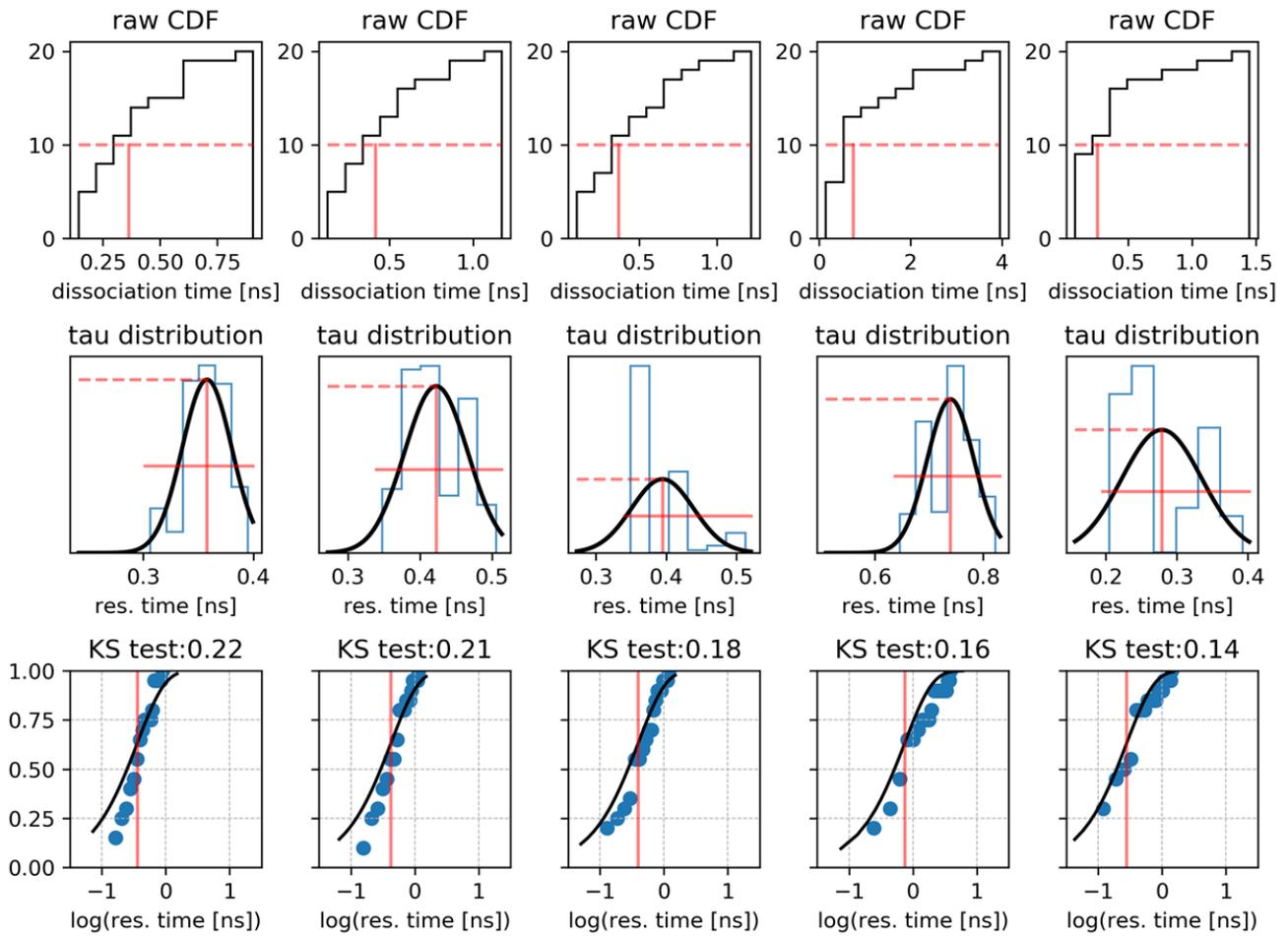
**Figura 11.5.** Evaluación de la estructura de la  $\alpha$ -tubulina de *Homo sapiens* (HsAT) generado por Swiss-Model<sup>64</sup> usando el PDB: 5ca1 (cadena C)<sup>82</sup> como molde. (A) Gráfico de Ramachandran, (B) resultados de MolProbity, (C) puntajes QMEAN4, (D) estructura tridimensional coloreada por la confianza del modelo, (E) similitud local respecto al molde, (F) puntuación normalizada de QMEAN4 y (G) calidad de los residuos coloreados por su valor local de calidad.



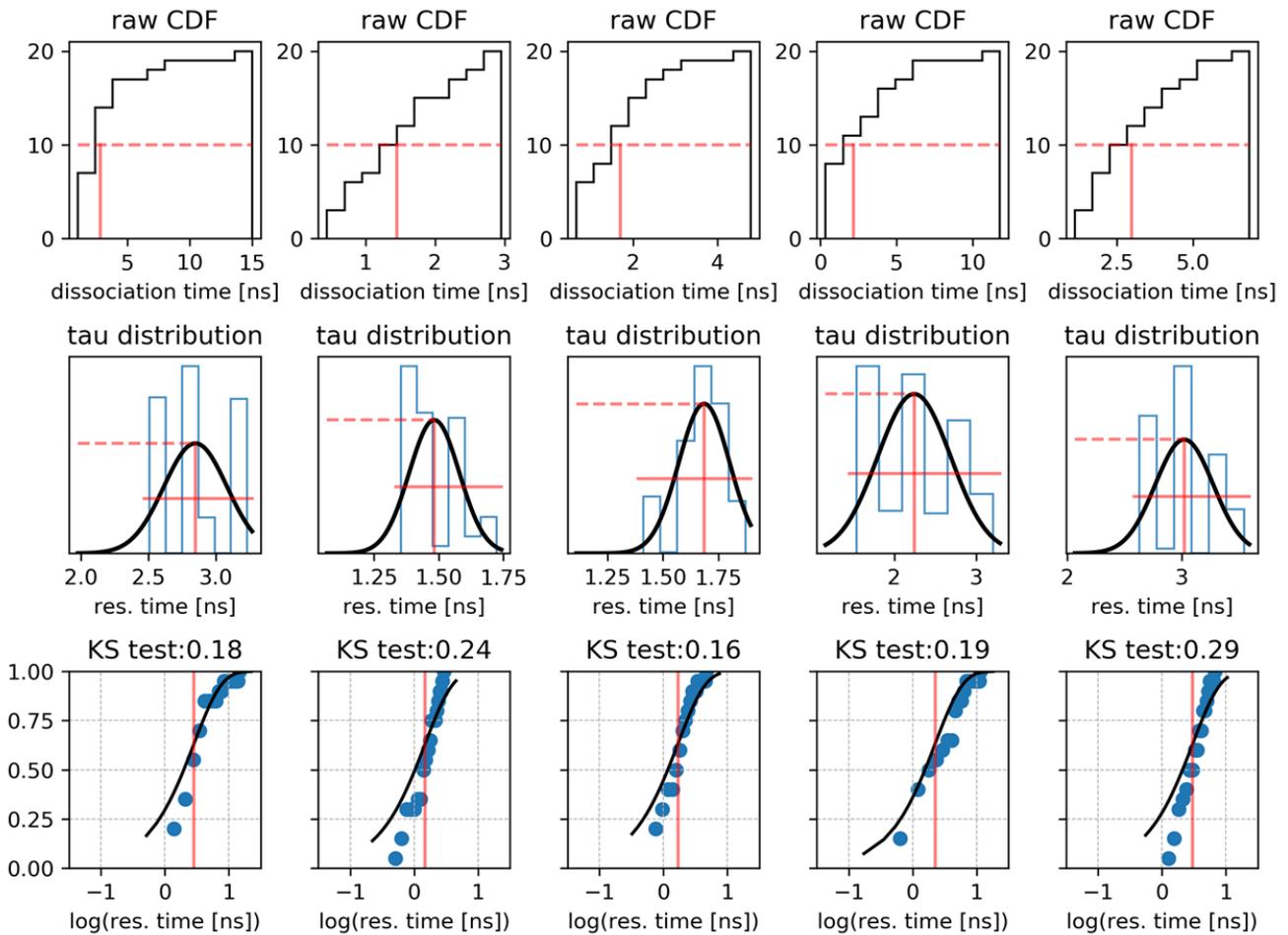
**Figura 11.6.** Dinámica molecular de GB-II-5 en PfAT, LmAT, GiAT y HsAT. Diagrama de la desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) (izquierda), RMSD de análisis grupos (centro) y contribuciones energéticas por residuo (derecha).



**Figura 11.7.** Dinámica molecular de GB-II-46 en PfAT, LmAT, GiAT y HsAT. Diagrama de la desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) (izquierda), RMSD de análisis grupos (centro) y contribuciones energéticas por residuo (derecha).



**Figura 11.8.** Distribuciones de tiempo de residencia de ORY en *Toxoplasma gondii*. Gráfica acumulativa de tiempos de residencia (superior), distribución normalizada de tiempos de residencia (centro) y prueba de Kolmogorov-Smirnov (inferior).



**Figura 11.9.** Distribuciones de tiempo de residencia de ORY en *Homo sapiens*. Gráfica acumulativa de tiempos de residencia (superior), distribución normalizada de tiempos de residencia (centro) y prueba de Kolmogorov-Smirnov (inferior).