



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Estudio computacional de la interacción de dietofencarb  
y carbendazim con la  $\beta$ -tubulina de *Botrytis cinerea***

**T E S I S**

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

**PRESENTA**

**Efrén Mar Antonio**



**Ciudad Universitaria, CDMX**

**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>    | Aguayo Ortiz Rodrigo            |
| <b>VOCAL:</b>         | González Méndez Israel          |
| <b>SECRETARIO:</b>    | Martínez Caballero Carol Siseth |
| <b>1er. SUPLENTE:</b> | Guzmán Ocampo Dulce Consuelo    |
| <b>2° SUPLENTE:</b>   | Mendoza Jasso María Eugenia     |

**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:**

Efrén Mar Antonio

---

## **Agradecimientos**

Esta investigación ha sido 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 la Dirección General de Cómputo y Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) por el apoyo recibido en el uso de la supercomputadora “Miztli” HP Cluster Platform 3000SL (LANCAD-UNAM-DGTIC-398).

---

**ÍNDICE GENERAL**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b> .....  | <b>0</b>  |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>II. ANTECEDENTES</b> .....  | <b>2</b>  |
| II.1. <i>Botrytis cinerea</i> .....  | 2         |
| II.2. Fungicidas empleados contra <i>B. cinerea</i> .....                            | 3         |
| II.3. Tubulina y microtúbulos.....   | 5         |
| II.4. Mutaciones en la tubulina .....  | 7         |
| II.5. Sitios de unión reportados .....   | 9         |
| <b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>IV. HIPÓTESIS</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>V. OBJETIVO GENERAL</b> .....   | <b>11</b> |
| V.1. Objetivos particulares.....   | 11        |
| <b>VI. METODOLOGÍA</b> .....   | <b>12</b> |
| VI.1. Construcción de heterodímero de tubulina.....                                  | 12        |
| VI.1.1. Análisis de secuencias .....   | 12        |
| VI.1.2. Construcción del modelo.....   | 12        |
| VI.2. Preparación de ligandos.....   | 13        |
| VI.2.1. Preparación de CBZ y DEF .....   | 13        |
| VI.2.2. Preparación de análogos de DEF .....   | 13        |
| VI.3 Acoplamiento molecular .....  | 13        |
| VI.4 Dinámica molecular.....   | 14        |
| VI.5 Tiempo de residencia ( $\tau$ RAMD).....  | 14        |
| VI.6 Mutaciones que afectan las interacciones proteína-ligando.....                  | 15        |
| VI.6.1. Efecto de las mutaciones en la estabilidad de los ligandos.....              | 15        |
| VI.6.1. Efecto de las mutaciones en la estabilidad de la proteína.....               | 15        |
| <b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....   | <b>17</b> |
| VII. 1. Construcción del heterodímero de $\alpha/\beta$ -tubulina.....               | 17        |
| VII.1.1. Análisis de secuencias y modelado por homología.....                        | 17        |
| VII.2. Acoplamiento molecular .....  | 18        |
| VII.2.1. Perfil de interacción de CBZ y DEF en el sitio de los bencimidazoles.....   | 18        |
| VII.3. Dinámica molecular.....   | 20        |
| VII.3.2. Caracterización dinámica de CBZ y DEF en el sitio de los bencimidazoles.... | 23        |
| VII.4. Tiempo de residencia ( $\tau$ RAMD).....                                      | 24        |
| VII.5. Mutaciones que afectan la susceptibilidad a los fungicidas .....              | 27        |
| VII.5.1. Efecto de mutaciones en la afinidad de los ligandos.....                    | 27        |
| VII.5.2. Efecto de mutaciones en la estabilidad de la proteína .....                 | 29        |
| VII.6. Cribado virtual .....   | 30        |
| <b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....  | <b>34</b> |
| <b>IX. PERSPECTIVAS</b> .....  | <b>35</b> |
| <b>X. APÉNDICE</b> .....   | <b>36</b> |
| <b>XI. REFERENCIAS</b> .....   | <b>41</b> |

### ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

|                  |   |
|------------------|---|
| AA               | Aminoácido  |
| DEF              | Dietofencarb                                      |
| CBZ              | Carbendazim                                       |
| CE <sub>50</sub> | Concentración efectiva 50                         |
| ZOX              | Zoxamida  |
| GDP              | Guanosín difosfato                                |
| GTP              | Guanosín trifosfato                               |
| NZO              | Nocodazol   |
| A                | Adenina   |
| G                | Guanina   |
| T                | Timina  |
| C                | Citosina  |
| PDB              | <i>Protein Data Bank</i>                          |
| C-β              | Carbono-β   |
| MMFF94s          | <i>Merck Molecular Force Field</i>                |
| SD               | <i>steepest descent</i>                           |
| UFF              | <i>Universal Force Field</i>                      |
| AMDock           | <i>Assisted Molecular Docking</i>                 |
| NVT              | Ensamble canónico                                 |
| NPT              | Ensamble isotérmico-isobárico                     |
| RMSD             | Desviación de la raíz cuadrática media            |
| RMSF             | Fluctuación de la raíz cuadrática media           |
| PLIP             | <i>Protein-Ligand Interaction Profile</i>         |
| HB               | Puentes de hidrógeno                              |
| HI               | Interacciones hidrofóbicas                        |
| T <sub>R</sub>   | Tiempo de residencia                              |
| τRAMD            | <i>tau-Random Acceleration Molecular Dynamics</i> |
| BAR              | <i>Bennett's Accpetance Ratio</i>                 |
| ΔΔG              | Doble diferencia de energía de unión              |
| VS               | <i>Virtual screening</i>                          |
| EL               | Eficiencia del ligando                            |
| HA               | <i>Heavy atoms</i>                                |

### I. INTRODUCCIÓN

El moho gris, causado por el hongo patógeno *Botrytis cinerea*, afecta a una gran variedad de especies de consumo humano y se considera una de las enfermedades más destructivas que amenaza su producción. En la actualidad, el uso de fungicidas antitubulina es la forma más eficiente de controlar este hongo patógeno, aunque la eficacia de estos ha disminuido por la aparición de cepas resistentes.<sup>1</sup> Dentro de los principales agentes antitubulina encontramos a los bencimidazoles, los *N*-fenilcarbamatos y las benzamidas. La tubulina es un dímero de proteína compuesto de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , que al polimerizarse forma los llamados microtúbulos, los cuales juegan un papel fundamental en diferentes funciones biológicas. La función de los microtúbulos requiere en muchos casos el ensamblaje reversible de la tubulina, por lo cual, se ha demostrado que los agentes antitubulina irrumpen este proceso, ya sea al inhibir el ensamblaje de los microtúbulos o al estabilizarlos.<sup>2</sup> En la actualidad, se han identificado diferentes mutaciones que conducen a la pérdida de la sensibilidad a los agentes antitubulina, siendo las ocurridas en la posición 198 y 200 las de mayor importancia, por lo que el desarrollo de nuevos compuestos fungicidas resulta de importancia para el control de este hongo patógeno.<sup>3</sup>

En este trabajo, se determinó el perfil de interacción de los fungicidas DEF y CBZ en el heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina por medio de estudios de acoplamiento molecular, y se evaluaron los cambios en el tiempo con ayuda de dinámica molecular. Adicionalmente, con ayuda herramientas químicas fue posible estimar los cambios en la afinidad de los ligandos por medio del cálculo de la doble diferencia de energía de unión ocasionado por las distintas mutaciones reportadas que confieren resistencia. De igual manera, a través de servidores en línea, se pudo determinar el efecto que tienen las mutaciones que no afectan la estabilidad de los ligandos. Finalmente, se recopilaron diferentes análogos del fungicida DEF para estudiar su perfil de interacción y seleccionar algunos candidatos que pudieran ser utilizados como nuevos agentes fungicidas.

Todo el conocimiento generado en este proyecto aportará información valiosa para el diseño racional de nuevos compuestos con mayor selectividad y actividad contra el hongo patógeno *B. cinerea*.

## **II. ANTECEDENTES**

### **II.1. *Botrytis cinerea***

*Botrytis cinerea*, el agente causal del moho gris es un hongo patógeno responsable de la descomposición de frutas y verduras. Las infecciones por *B. cinerea* pueden ocurrir antes de la cosecha, durante la etapa de campo y permanecer latentes hasta el almacenamiento.<sup>4</sup> Las especies de *Botrytis* generalmente tienen un rango de hospederos estrecho, limitándose a infectar a una sola especie o a un grupo de especies relacionadas. Sin embargo, *B. cinerea* puede infectar a más de 500 especies de cultivos de frutas y verduras, por lo que se considera de mayor importancia agrícola.<sup>5</sup> La invasión del hongo al hospedero comienza a partir de tejidos dañados o aberturas naturales, lo que permite que el hongo establezca la infección, como se observa en la **Figura 2.1**.



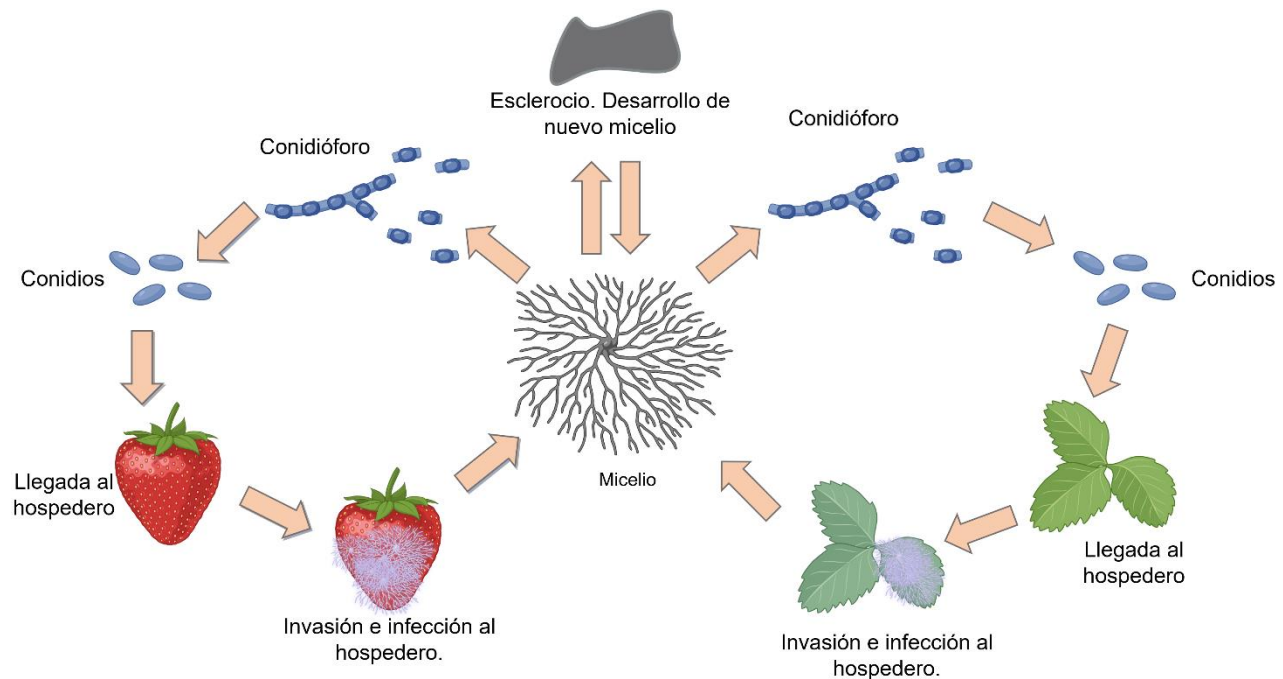
**Figura 2.1.** Aspecto general de frutas y verduras infectadas por el hongo patógeno *B. cinerea*.

De manera inicial, se produce un daño limitado en el tejido, pero la producción masiva de conidios permite su rápida propagación. Después de la infección inicial, el hongo entra en una fase breve en la que existe como biótrofo dentro del hospedero. Más tarde, ingresa en una fase necrotrófica, donde comienza con la secreción de factores de virulencia como ácido oxálico, enzimas de degradación de pared celular y análogos de hormonas vegetales que alteran el metabolismo del huésped, su sistema inmunitario y estructura celular. El efecto final de los factores de virulencia es la descomposición de la fruta, lo que resulta en ablandamiento de la pulpa y una piel marrón o coriácea.<sup>5</sup>

*B. cinerea* tiene un gran impacto en varios cultivos de importancia económica, como lo son la uva, la fresa, el tomate y puede estar presente en tallos, hojas, flores, frutos y semillas. Se



estima que las pérdidas económicas anuales debidas a este hongo superan fácilmente los 10,000 millones de dólares en todo el mundo.<sup>6</sup> La aplicación de agroquímicos ha sido considerada como la forma más eficiente de controlar a *B. cinerea*, rociándose más de 500 millones de dólares en fungicidas. Dentro de los fungicidas más utilizados para la eliminación de este hongo patógeno, se encuentran los bencimidazoles, *N*-fenilcarbamatos, dicarboxamidas, anilino pirimidinas, inhibidores externos de quinona, inhibidores del succinato deshidrogenasa, fenilpirroles y benzamidas.<sup>1</sup> En la **Figura 2.2**, se muestra el ciclo de infección de este hongo.

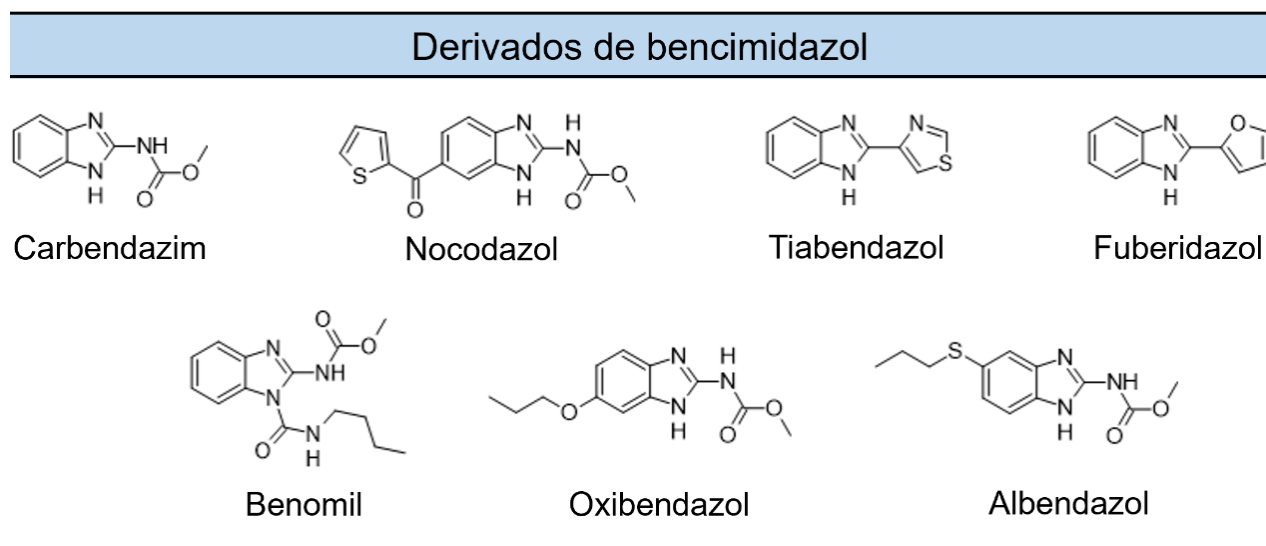


**Figura 2.2.** Ciclo de infección de *B. cinerea*. Se transmite principalmente por aire, ya que los conidios liberados de los conidióforos sirven como principal medio de transmisión. Este hongo patógeno cuenta con alto rendimiento reproductivo, amplia gama de huéspedes y capacidad de sobrevivir durante periodos prolongados como conidios y/o pequeñas masas de micelio endurecido, conocidas como esclerocios, los cuales, en condiciones favorables, dan pie a la formación de nuevo micelio.<sup>5</sup>

## II.2. Fungicidas empleados contra *B. cinerea*

Los diferentes fungicidas empleados contra *B. cinerea* pueden clasificarse con base en su mecanismo de acción en: agentes que afectan la respiración fúngica, osmorregulación, biosíntesis de metionina o esteroides, y los agentes que alteran la función de los microtúbulos o antitubulina, siendo estos últimos los más empleados en la actualidad. Dentro de este último grupo encontramos tres clases estructurales principales: 1) bencimidazoles, 2) *N*-fenilcarbamatos y 3) benzamidas.<sup>2,7</sup> Los derivados bencimidazol-2-carbamato de metilo son un

grupo de compuestos empleados principalmente como fungicidas y antihelmínticos, aunque se sabe que algunos tienen propiedades anticancerígenas.<sup>8</sup> Los más utilizados para estos fines incluyen al albendazol, carbendazim (CBZ), benomil, fuberidazol, tiabendazol, nocodazol, oxibendazol, entre otros (**Figura 2.3**). Este grupo de compuestos se introdujeron por primera vez a finales de la década de los 60's como fungicidas altamente efectivos para el control de un amplio espectro de patógenos *ascomycetos* y *basidiomicetos*. Asimismo, estos compuestos han sido utilizados para combatir el moho gris producido por *B. cinerea*, siendo el CBZ el primer bencimidazol empleado para esos fines.<sup>6</sup> En la actualidad, la eficacia de esta clase de compuestos para el control de distintos patógenos ha disminuido debido a la aparición de cepas resistentes alrededor de todo el mundo.<sup>3</sup>

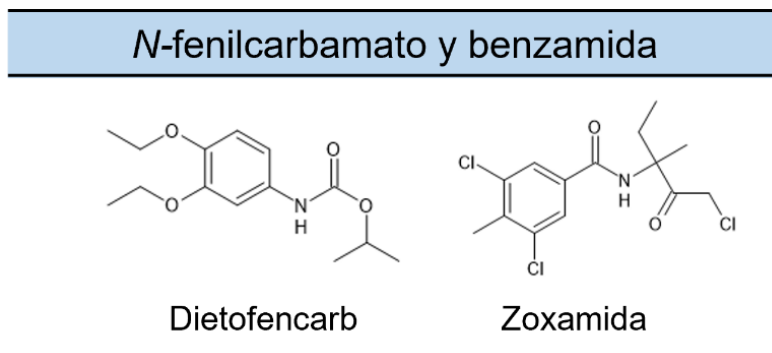


**Figura 2.3.** Estructura química de los principales compuestos derivados de bencimidazol.

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad fungicida llevó al hallazgo de que ciertos herbicidas *N*-fenilcarbamatos eran activos frente a hongos resistentes a CBZ, lo que condujo al descubrimiento de dietofencarb (DEF). El principal uso comercial de este compuesto es para el control de las cepas resistentes al tratamiento con bencimidazoles como CBZ.<sup>2</sup>

Por su parte, el grupo de las benzamidas incluye a la zoxamida (ZOX), la cual se emplea principalmente para el control de enfermedades ocasionadas por *oomycetos*. Sin embargo, la ZOX, al igual que otras benzamidas que contienen  $\alpha$ -halocetonas, ha mostrado actividad contra hongos no superiores como *B. cinerea*.<sup>2</sup> Al igual que DEF, ZOX ha sido empleada para el tratamiento de cepas de *B. cinerea* resistentes a CBZ.

Los tres compuestos antes mencionados inhiben el ensamblaje de los microtúbulos al unirse de forma selectiva a la tubulina. En el caso de CBZ, se ha descrito el sitio de unión de derivados de bencimidazol en la tubulina, mientras que el sitio de unión para ZOX y DEF aún no ha sido identificado.



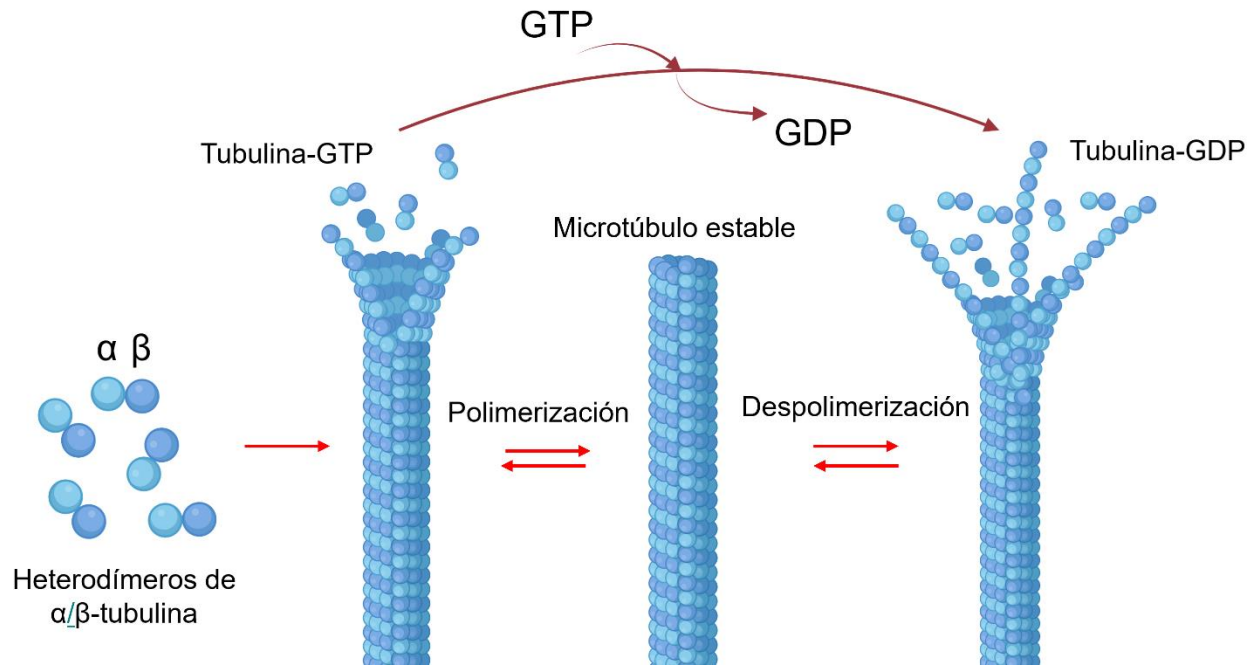
**Figura 2.4.** Estructura química de agentes fungicidas utilizados como alternativas al tratamiento con derivados del CBZ.

### II.3. Tubulina y microtúbulos

La tubulina es una proteína globular de unión a guanosín trifosfato (GTP) de aproximadamente 55kDa, que se encuentra presente en todas las células eucariotas. Existen 23 genes funcionales que codifican para tubulina en el genoma humano, y se clasifican en 5 familias:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Mientras que las tubulinas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  están presentes en el centrosoma, las tubulinas de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  son los principales componentes de los microtúbulos.<sup>9</sup> Los microtúbulos juegan un papel importante en varias funciones biológicas, que van desde el tráfico intracelular y el posicionamiento de los componentes celulares en la interfase y la formación de huso mitótico durante la división celular, hasta el establecimiento y mantenimiento de la morfología y motilidad celular.<sup>10</sup>

Los microtúbulos son cilindros largos y huecos con un diámetro de 24 nm que por lo general consisten en 13 protofilamentos que se asocian lateralmente y se forman a partir la polimerización de heterodímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina. Todas las subunidades de  $\alpha/\beta$ -tubulina presentes en un protofilamento están dispuestas de tal manera que la  $\beta$ -tubulina apunta hacia el llamado extremo positivo y la  $\alpha$ -tubulina apunta hacia el llamado extremo negativo.<sup>9,11</sup> Ambos extremos están involucrados en ciclos alternados de alargamiento y acortamiento mediante la unión de nuevos heterodímeros, manteniendo el microtúbulo en un estado denominado "inestabilidad dinámica". Tanto la  $\alpha$  como  $\beta$ -tubulina se asocian a GTP en su región N-terminal, pero solamente el GTP unido a la  $\alpha$ -tubulina es estable, mientras que el GTP unido a la  $\beta$ -

tubulina puede hidrolizarse a guanosín difosfato (GDP). Mientras se mantenga en el extremo positivo  $\beta$ -tubulina-GTP, la polimerización de los microtúbulos es continua. Si por el contrario el microtúbulo presenta una molécula de GDP en su extremo, éste es inestable y se despolimeriza rápidamente<sup>12</sup> (**Figura 2.5**).

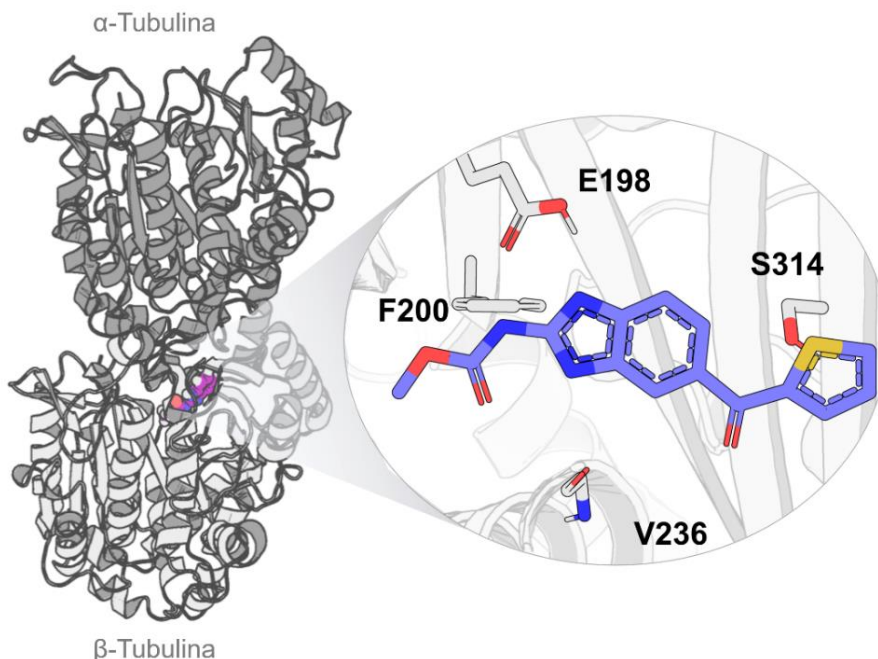


**Figura 2.5.** Equilibrio de polimerización y despolimerización de la tubulina.

El papel fundamental de los microtúbulos en las diferentes funciones celulares hace que estos sean blancos importantes para el tratamiento contra parásitos y cáncer. Un gran número de compuestos químicamente diversos pueden unirse a los microtúbulos, alterando la dinámica al inhibir su polimerización o estabilizarlos, lo que puede conducir a muerte celular. Esto último al interferir con la formación del huso mitótico y bloquear la división celular o al afectar el tráfico intracelular de moléculas y orgánulos importantes.<sup>10,13</sup>

En cuanto a los agentes contra microtúbulos, se han descrito diferentes sitios de unión en la tubulina que permiten explicar su mecanismo de acción. En primer lugar, tenemos a los sitios de unión del taxol y laulimalida, los cuales actúan como agentes estabilizadores de los microtúbulos. Por su parte, la maytansina, colchicina, vinblastina y pironetina actúan como agentes desestabilizadores de los microtúbulos. Estudios cristalográficos muestran un sitio adicional de agentes dirigidos a microtúbulos ubicado cerca del sitio de unión de la colchicina, el cual ha sido clasificado como el sitio del nocodazol o de los bencimidazoles.

El nocodazol (NZO), que es un derivado bencimidazol-2-carbamato de metilo, se identificó en este nuevo sitio, permitiendo explicar el mecanismo de acción de este grupo de compuestos.<sup>14</sup> El NZO, al igual que otros derivados del CBZ, bloquea la división celular al unirse de manera selectiva a la  $\beta$ -tubulina, previniendo el ensamblaje de los microtúbulos (**Figura 2.6**).



**Figura 2.6.** Modo de unión del nocodazol en la  $\beta$ -tubulina de *B. cinerea* (PDB:5CA1)<sup>15</sup>

Desafortunadamente, se han identificado mutaciones en el monómero de  $\beta$ -tubulina de parásitos y hongos, como *B. cinerea*, que confieren resistencia al tratamiento a este grupo de agentes inhibidores de la polimerización.<sup>2,10</sup>

#### II.4. Mutaciones en la tubulina

Como se mencionó anteriormente, el control químico de *B. cinerea* se ha visto gravemente afectado por el desarrollo de resistencia a los fungicidas comerciales como los bencimidazoles. A la fecha, se han aislado varias cepas resistentes de este hongo patógeno en cultivos de todo el mundo. La introducción de CBZ y mezclas de DEF para el control de esta cepa se utilizó de manera inicial en respuesta a la aparición de cepas resistentes a los bencimidazoles; sin embargo, esta mezcla resultó en la aparición de cepas resistentes a ambos compuestos. Se han identificado diferentes fenotipos en aislados resistentes a bencimidazoles. En primer lugar, el fenotipo BenS presenta sensibilidad tanto a CBZ y ZOX, pero resulta insensible a DEF. Por su parte, BenR1 presenta sensibilidad a ZOX y DEF, pero resistencia a CBZ. Este último

fenotipo es causado por una mutación puntual de GAG en aislados susceptibles a GCG en la posición 198 de la  $\beta$ -tubulina, lo que conduce a un reemplazo de un ácido glutámico a alanina (E198A).

Por otro lado, los aislados BenR2, el cual se detectó tras la introducción de las mezclas de CBZ-DEF, muestran resistencia a CBZ y ZOX, manteniendo además la insensibilidad hacia DEF. Esta clase de aislados se generan debido a una mutación puntual de TTC a TAC en la posición 200, donde una tirosina reemplaza a una fenilalanina (F200Y). Finalmente, el fenotipo BenR3 genera resistencia a CBZ y una sensibilidad moderada a DEF. Este fenotipo se origina por la mutación puntual de GAG a GTG en la posición 198, provocando un cambio de ácido glutámico a valina (E198V). Adicionalmente, se ha identificado una sustitución de ácido glutámico a lisina en la posición 198 (E198K) que genera resistencia a las tres clases de fungicidas antitubulina mencionados.<sup>7,16–18</sup> Finalmente, la mutación L240F ha sido reportada como causante de resistencia en diferentes aislados al tratamiento con carbamatos bencimidazolicos.<sup>19</sup> En la **Tabla 2.1** se muestran los resultados experimentales de sensibilidad a los fungicidas CBZ, DEF y ZOX en aislados de *B. cinerea* en donde se evalúa la concentración a la que se inhibe el 50% del crecimiento radial del hongo ( $EC_{50}$ ).

**Tabla 2.1.** Resultados de sensibilidad a CBZ, DEF y ZOX en aislados de *B. cinerea*.

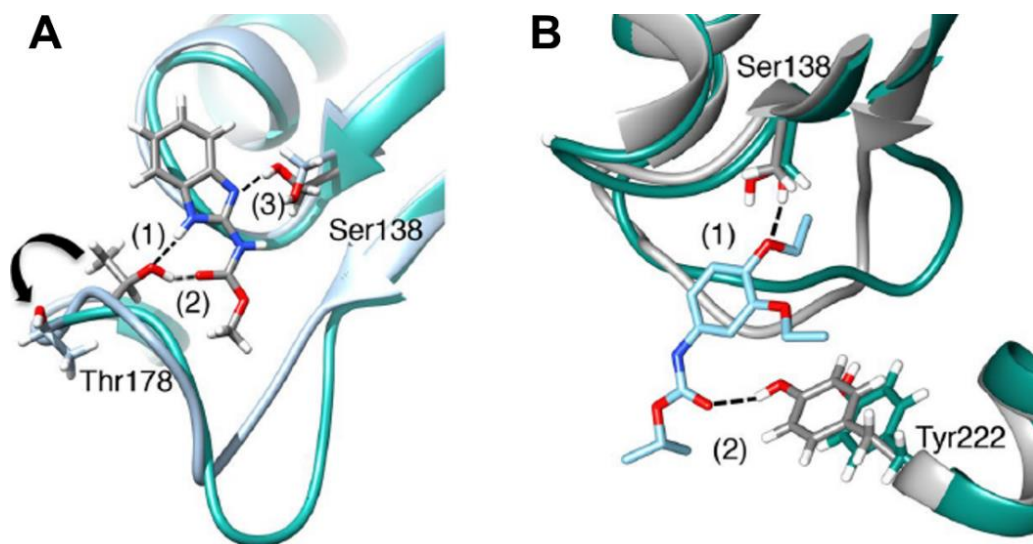
| Sensibilidad a fungicidas ( $\mu\text{g/ml}$ ) |               |                    |                    |                     |
|--|---------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Fenotipo                                       | AA sustituido | Carbendazim (CBZ)  | Dietofencarb (DEF) | Zoxamida (ZOX)      |
| BenS   | Silvestre     | 0.1 <sup>20</sup>  | >25 <sup>16</sup>  | 0.10 <sup>16</sup>  |
| BenR1  | E198A         | > 25 <sup>20</sup> | 0.1 <sup>20</sup>  | 0.012 <sup>16</sup> |
| BenR2  | F200Y         | 6.6 <sup>20</sup>  | > 25 <sup>20</sup> | 7.76 <sup>1</sup>   |
| -  | E198K         | > 25 <sup>20</sup> | > 25 <sup>20</sup> | > 15 <sup>21</sup>  |
| BenR3  | E198V         | > 25 <sup>20</sup> | 0.7 <sup>20</sup>  | 0.91 <sup>21</sup>  |

Con base en la información experimental reportada acerca del efecto que tienen las mutaciones de la tubulina en la actividad de los ligandos, esto puede sugerir que DEF y ZOX se unen a un sitio en común junto a los bencimidazoles.

## II.5. Sitios de unión reportados

Como se mencionó previamente, nuestro objetivo principal radica en la propuesta del posible sitio de unión para CBZ y DEF en la  $\beta$ -tubulina de *B. cinerea*. De manera paralela a este proyecto, en nuestro grupo de investigación se trabajó con la ZOX, fungicida perteneciente al grupo de la benzamidas y que, de igual manera su sitio de unión aún no está definido. La generación de nuevo conocimiento acerca de estos tres fungicidas antitubulina, resulta de gran importancia para la búsqueda de nuevas alternativas para el control de este hongo patógeno, haciendo énfasis en que, el principal interés radica en el estudio de CBZ y DEF.

En cuanto a la información experimental previa, en anteriores investigaciones, se ha propuesto un posible sitio de unión para CBZ y DEF en la  $\beta$ -tubulina de *B. cinerea* (**Figura 2.7**). En dicho trabajo, los autores proponen un sitio de unión formado por los residuos 135-142 y 175-185<sup>22</sup> en la  $\beta$ -tubulina, sin embargo, esta aproximación puede no ser correcta, debido a que los diferentes grados de susceptibilidad a los diferentes fungicidas está dada por mutaciones en las posiciones 198 y 200 principalmente, residuos que forman parte del sitio de unión de los bencimidazoles. Es por esto por lo que en nuestro grupo de investigación proponemos este sitio de unión para DEF y CBZ, basados en el efecto de las mutaciones en los cambios de sensibilidad en ambos compuestos, y en el caso de CBZ al tratarse de un derivado de bencimidazol-2-carbamato de metilo. Esta información será de gran utilidad para el diseño de nuevos agentes antifúngicos.



**Figura 2.7.** Sitio de unión propuesto por Vela y colaboradores<sup>23</sup> para **A)** CBZ y **B)** DEF en la  $\beta$ -tubulina de *B. cinerea*.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

*Botrytis cinerea*, causante del moho gris, es un hongo patógeno que ocasiona pérdidas económicas considerables que superan los 10 millones de dólares anuales en una variedad de frutas y verduras de consumo humano, tales como fresas, tomates, uvas, entre otros. Los fungicidas que actúan sobre los microtúbulos como DEF y CBZ se usan ampliamente para el control de este hongo patógeno. Dichos compuestos ejercen su acción interrumpiendo el ensamblaje de los microtúbulos o induciendo su despolimerización al unirse a la subunidad  $\beta$  del heterodímero de tubulina, lo que puede conducir a la muerte celular. Sin embargo, con la aparición de cepas resistentes a estos compuestos, es necesario la búsqueda de nuevas alternativas para el control de este hongo patógeno. Es por ello por lo que en este trabajo se busca obtener información acerca del mecanismo de acción a nivel molecular de los fungicidas CBZ y DEF y, de esta manera, conocer las interacciones clave para la actividad biológica, así como establecer el efecto de las mutaciones en la  $\beta$ -tubulina que conducen a resistencia. Lo anterior permitirá proponer el posible sitio de unión de ambos compuestos para el futuro desarrollo de nuevos agentes fungicidas más potentes y efectivos.

### **IV. HIPÓTESIS**

Con ayuda de diferentes herramientas y metodologías computacionales, será posible estudiar el modo de unión y comportamiento dinámico de los fungicidas comerciales CBZ y DEF en el heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina de *B. cinerea*, así como determinar el efecto de ciertas mutaciones en la actividad de estos compuestos que conducen a la generación de cepas resistentes y adquirir conocimiento en cuanto a los procesos cinéticos involucrados en estos sistemas.



### V. OBJETIVO GENERAL

Emplear herramientas de química y bioquímica computacional para proponer el posible sitio de unión de CBZ y DEF en la  $\beta$ -tubulina del hongo patógeno *Botrytis cinerea*.

#### V.1. Objetivos particulares

- Llevar a cabo un análisis de secuencias y modelado por homología para la construcción de un modelo tridimensional del heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina de *B. cinerea*.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular de DEF y CBZ en los modelos silvestre y mutante de la  $\beta$ -tubulina de *B. cinerea*.
- Emplear dinámica molecular para describir el comportamiento dinámico de los complejos proteína-ligando  $\alpha/\beta$ -tubulina-DEF y  $\alpha/\beta$ -tubulina-CBZ.
- Estudiar el efecto de las mutaciones sobre la afinidad de los ligandos y la estabilidad de la proteína a través de métodos de transmutación atómica y el uso de distintos servidores en línea.
- Aplicar la metodología de  $\tau$ RAMD para conocer el mecanismo de disociación proteína-ligando, así como para estimar el tiempo de residencia de DEF y CBZ en la  $\beta$ -tubulina.
- Realizar un cribado virtual para la selección de diferentes análogos estructurales de DEF como punto de partida para el diseño de nuevos compuestos con actividad antifúngica.

## **VI. METODOLOGÍA**

En el presente trabajo, se realizó una revisión bibliográfica de los inhibidores de la polimerización de la tubulina carbendazim (CBZ) y dietofencarb (DEF) con actividad reportada contra *B. cinerea*. Para la identificación del sitio y modo de unión, primero se llevó a cabo la construcción de los modelos tridimensionales del heterodímero  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina de *B. cinerea*, tanto la forma silvestre (BcABT<sub>WT</sub>) como de la mutante (BcABT<sub>E198A</sub>). Posteriormente, se recolectaron los ligandos de estudio con ayuda de una base de datos pública y se prepararon empleando diferentes aproximaciones de química computacional. Con los modelos anteriores, se realizaron los estudios de acoplamiento y dinámica molecular para determinar el modo de unión y comportamiento dinámico de los complejos proteína-ligando, respectivamente. Adicionalmente, se evaluó el efecto que tienen diferentes mutaciones en la afinidad de los ligandos o en la estabilidad de la proteína y se determinó el tiempo de residencia para ambos compuestos. De manera complementaria, se realizó un cribado virtual de una serie de compuestos con similitud estructural a DEF, de los cuales se seleccionaron los mejores con ayuda de diferentes funciones de evaluación. En las siguientes subsecciones, se describe detalladamente la metodología seguida para este proceso.

### **VI.1. Construcción de heterodímero de tubulina**

#### *VI.1.1. Análisis de secuencias*

Del servidor en línea UniProt<sup>24</sup>, se identificaron y obtuvieron las secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina de *B. cinerea* en formato FASTA. En el caso de la  $\beta$  tubulina, la base de datos contenía una secuencia revisada (Uniprot ID: P53373), mientras que para la  $\alpha$ -tubulina (Uniprot ID: A0A384J7P6) fue necesario realizar una comparación entre las secuencias recopiladas en la base de datos para *B. cinerea* y una secuencia de  $\alpha$ -tubulina de referencia proveniente del organismo *Sus barbatus*. Esta secuencia de referencia fue tomada a partir de la estructura molde seleccionada para llevar a cabo el modelado por homología. La secuencia seleccionada para la construcción del modelo fue aquella que presentó mayor porcentaje de identidad respecto a la secuencia de referencia (Uniprot ID: A0A0R4I993).

#### *VI.1.2. Construcción del modelo*

Una vez seleccionadas las secuencias  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, el siguiente paso fue la construcción de la estructura tridimensional del heterodímero silvestre de tubulina (BcABT<sub>WT</sub>) con el servidor web Swiss-Model.<sup>25</sup> Para ello, se empleó como referencia la cadena C y D del heterotetrámero de tubulina obtenido en formato PDB de la base de datos *Protein Data Bank*<sup>26</sup> (PDB ID:

5CA1).<sup>15</sup> Como se mencionó en el punto anterior, la cadena C (subunidad  $\alpha$ ) proviene del organismo *S. barbatus*, mientras que la cadena D (subunidad  $\beta$ ) proviene de *Gallus gallus*. Adicionalmente, a nuestro modelo se le incorporó una molécula de GTP en la  $\alpha$ -tubulina, una molécula de GDP en la  $\beta$ -tubulina e iones  $Mg^{2+}$  coordinados con estos cofactores en cada una de las subunidades. Las estructuras tridimensionales de los modelos generados para ambas estructuras se sometieron a una validación global y local con el servidor SwissModel. A partir de estos modelos validados, se utilizó el programa PyMol v2.5.4 para generar el heterodímero silvestre (BcABT<sub>WT</sub>) y el modelo con la mutación E198A (BcABT<sub>E198A</sub>). Finalmente, ambos modelos fueron sometidos a una minimización de energía y optimización de la geometría con ayuda del programa UCSF Chimera v1.16.<sup>27</sup>

### VI.2. Preparación de ligandos

#### VI.2.1. Preparación de CBZ y DEF

Las estructuras tridimensionales de ambos ligandos se obtuvieron de la base de datos PubChem<sup>28</sup> en formato SDF. Con estas estructuras, se llevó a cabo una primera optimización geométrica y minimización de la energía empleando el campo de fuerza *Merck Molecular Force Field* (MMFF94s)<sup>29</sup> y el algoritmo de optimización *steepest descent* (SD)<sup>30</sup> con el programa Avogadro<sup>31</sup>. El archivo de salida proveniente de la primera optimización se guardó en formato PDB para posteriormente ser sometido a una optimización *ab initio* con Gaussian16<sup>32</sup> empleando el método B3LYP con un nivel de teoría 6-31G.

#### VI.2.2. Preparación de análogos de DEF

Se recopilaron 635 estructuras tridimensionales de los compuestos con una similitud mayor al 90 % a la estructura de DEF en la base de datos PubChem. Para la preparación de todas las estructuras, se llevó a cabo una primera minimización de energía en el programa OpenBabel utilizando el campo de fuerza *Universal Force Field* (UFF)<sup>33</sup>, seguido de una optimización semiempírica empleando el método PM6.<sup>34</sup>

### VI.3 Acoplamiento molecular

Se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular (*docking*) de CBZ y DEF en el sitio de unión de los bencimidazoles de los modelos BcABT<sub>WT</sub> y BcABT<sub>E198A</sub> empleando los módulos de Autodock Vina<sup>35</sup> y Autodock4<sup>36</sup> incluidos en el programa AMDock (*Assisted Molecular Docking*) v1.6.2.<sup>37</sup> Se realizó un acoplamiento de tipo rígido-flexible, definiendo el espacio de búsqueda en el sitio del nocodazol (NZO) con una caja cúbica de 15 x 15 x 15 Å<sup>3</sup>. En los

parámetros de Autodock Vina, se estableció un valor exhaustividad de 50 y un número máximo de 20 poses, mientras que para Autodock4 se definió un número de corridas de 50 y una energía total de 5 millones de evaluaciones. A partir de los resultados obtenidos de Autodock Vina y Autodock4, se seleccionaron las poses que presentaron el mejor puntaje.

Para los análogos de DEF, se realizó un acoplamiento por grupos (*ensemble docking*) de las 635 estructuras recopiladas en el modelo BcABT<sub>E198A</sub> empleando Autodock Vina. Para definir el espacio de búsqueda, se calculó el centro geométrico de seis de los residuos que constituyen al sitio de unión propuesto (G134, A198, F200, V236, L253 y S314), estableciéndose una caja cúbica de 30 x 30 x 30 Å<sup>3</sup>, así como un valor de exhaustividad de en la búsqueda local de 100.

### VI.4 Dinámica molecular

Se llevaron a cabo simulaciones de 200 ns de dinámica molecular de los complejos DEF-BcABT<sub>E198A</sub>, CBZ-BcABT<sub>WT</sub> y CBZ-BcABT<sub>E198A</sub>, obtenidos de los estudios de acoplamiento molecular, en el programa GROMACS 2021<sup>38</sup> y empleando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN.<sup>39</sup> La parametrización de los ligandos se llevó a cabo a través del servidor en línea ACPYPE.<sup>40</sup> En cada sistema, se incorporaron los parámetros del GTP, GDP, iones Mg<sup>2+</sup> y de cada ligando a la topología del sistema. Se solvataron los sistemas con moléculas de agua del modelo TIP3P en una caja cúbica. Para neutralizar el sistema, se reemplazaron moléculas de solvente con iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> hasta alcanzar una concentración de 0.15 M. Cada uno de los sistemas se equilibró y minimizó la energía durante 100 ps bajo el ensamble canónico NVT e isotérmico-isobárico NPT. La temperatura de cada sistema se fijó en 300 K con el termostato modificado de Berendsen<sup>41</sup> y se estableció la presión a 1 bar con el baróstato de Parrinello-Rahman.<sup>42</sup>

Los análisis de la desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) y de la fluctuación de la raíz cuadrática media (RMSF, por sus siglas en inglés), así como el análisis de grupos (*clustering*) se realizaron empleando herramientas internas de la versión GROMACS 2019.6. GROMACS y PLIP\_v2.2.2<sup>43</sup> se usaron para el análisis de interacciones de puentes de hidrógeno (HB) e interacciones hidrofóbicas (HI), respectivamente.

### VI.5 Tiempo de residencia ( $\tau$ RAMD)

Se determinó el tiempo de residencia ( $T_R$ ) de DEF y CBZ en los modelos BcABT<sub>WT</sub> y BcABT<sub>E198A</sub> por medio de la metodología de dinámica molecular de aceleración aleatoria

$\tau$ RAMD (tau-Random Acceleration Molecular Dynamics)<sup>44</sup> empleando la versión de GROMACS 2020.5<sup>38</sup>. Del análisis de grupos o *clustering* de las simulaciones convencionales de dinámica molecular realizadas en el punto anterior, se extrajeron las 5 conformaciones o *snapshots* más representativas de cada sistema y cada una de ellas se sometió a 20 trayectorias de disociación con una duración máxima de 40 ns (total 100 trayectorias de disociación) aplicando una fuerza con una magnitud de  $420 \frac{kJ}{mol \cdot nm}$  equivalente a  $10 \frac{kcal}{mol \cdot \text{Å}}$  del centro de masa del ligando. Las direcciones aleatorias de la fuerza aplicada al ligando se redefinían cuando éste se movía menos de 0.0025 nm después de 50 pasos (100 frames). Se determinó el  $T_R$  promedio de las 5 réplicas y su desviación estándar mediante un análisis estadístico de distribución normal.

### VI.6 Mutaciones que afectan las interacciones proteína-ligando

#### VI.6.1. Efecto de las mutaciones en la estabilidad de los ligandos

Se estimaron los cambios en la energía libre de unión de DEF y CBZ ocasionados por mutaciones puntuales en la  $\beta$ -tubulina de *B. cinerea* con ayuda del programa PMX.<sup>45</sup> En el caso de CBZ, se evaluaron un total de 7 mutaciones: E198A, E198K, E198V, E198E\*, E198G, F200Y y L240F en el modelo BcABT<sub>WT</sub>, mientras que para DEF se evaluaron 4 mutaciones A198E, A198E\*, A198G y A198V partiendo del modelo BcABT<sub>E198A</sub>. De manera inicial, se generaron las topologías y estructuras híbridas de las formas apo y holo de los modelos BcABT<sub>WT</sub> y BcABT<sub>E198A</sub> utilizando PMX.<sup>46</sup> Los estados A y B de ambas formas se equilibraron con ensambles canónicos NVT y NPT para después ser sometidas a simulaciones convencionales de dinámica molecular de 20 ns. De estas últimas, se extrajeron un total de 100 conformaciones de los últimos 10 ns de la simulación para llevar a cabo simulaciones de 100 ps transmutación atómica independientes. Finalmente, se empleó el método de *Bennett's Acceptance Ratio* (BAR)<sup>47</sup> para calcular el valor de la doble diferencia de la energía libre de unión ( $\Delta\Delta G$ ) por medio de la ecuación:  $\Delta\Delta G_{unión}^{Mutación} = \Delta G_{holo}^{Mutación} - \Delta G_{apo}^{Mutación}$ .

#### VI.6.1. Efecto de las mutaciones en la estabilidad de la proteína

De manera complementaria al punto anterior, se estimó la doble diferencia de energía de plegamiento del modelo de  $\alpha/\beta$ -tubulina en su forma apo ocasionado por las mutaciones F200Y y L240F con el servidor en línea DynaMut<sup>48</sup>. Este servidor incluye otras aproximaciones como ENCoM<sup>49</sup> para un análisis de modo normal, y mCSM<sup>50</sup>, SDM<sup>51</sup> y DUET<sup>52</sup> para una predicción

basada en la estructura. Adicionalmente, se utilizaron los predictores basados en la estructura INPS-3D<sup>53</sup>, PremPS<sup>54</sup> y el servidor MUp<sup>55</sup> basado en la secuencia de aminoácidos. En cada uno de los servidores se cargó el heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina, acompañado de un archivo de texto con las mutaciones a evaluar.

---

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VII. 1. Construcción del heterodímero de $\alpha/\beta$ -tubulina

#### VII. 1.1. Análisis de secuencias y modelado por homología

Debido a que no se cuenta con información cristalográfica del modelo de estudio, la técnica de modelado por homología permitió obtener el modelo tridimensional del heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina del hongo patógeno *B. cinerea* (BcABT<sub>WT</sub>). La estructura de referencia (PDB: 5CA1) se eligió debido a que en ella se expone el sitio de los bencimidazoles, y en el cual se encuentra co-cristalizado el NZO. Para la selección de la secuencia de  $\alpha$ -tubulina de *B. cinerea*, se llevó a cabo un alineamiento de las seis secuencias depositadas en el PDB con la secuencia de nuestra estructura de referencia. Nuestro análisis de secuencias reveló un porcentaje de identidad del 77.78% respecto a la referencia en tres de las secuencias obtenidas (**Tabla A1** del anexo), las cuales presentaban entre ellas una similitud del 100% (**Tabla A2** del Anexo). Cabe mencionar que el modelo con la mutación E198A (BcABT<sub>E198A</sub>) fue generado debido a que, con base en la información experimental, DEF presenta actividad únicamente cuando está presente la mutación en la tubulina.

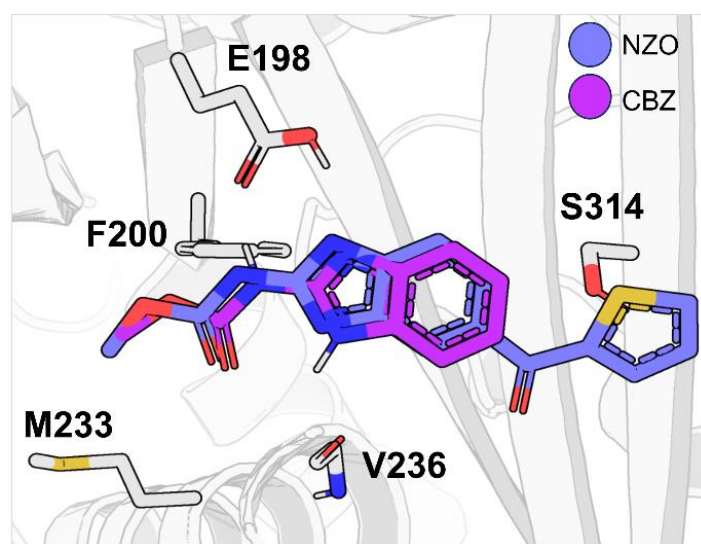
La evaluación local y global del modelo nos permite definir si los parámetros, tales como distancia entre átomos o ángulos de enlace, son coherentes respecto a la información existente en diferentes bases de datos. En la **Figura A1 y A2** del anexo se presentan los resultados de la validación para ambos modelos generados, y en donde es posible apreciar que nuestro modelo es adecuado debido a que los parámetros de evaluación local están dentro de los valores esperados y con un reducido número de alertas estructurales. En el diagrama de Ramachandran se muestra que más del 95% de los aminoácidos se encuentran en regiones favorecidas. Por otra parte, el número de choques (*clashes*) obtenidos fue mínimo, hubo pocas desviaciones de carbono- $\beta$  (C $\beta$ ) y pocos errores en las distancia y ángulos de enlace. Por su parte, la evaluación global presenta un valor de Z-score del QMEAN menor a dos, indicando que está dentro de los valores esperados respecto a otras proteínas depositadas en el PDB con el mismo número de residuos.

## VII.2. Acoplamiento molecular

### VII.2.1. Perfil de interacción de CBZ y DEF en el sitio de los bencimidazoles

Los estudios de acoplamiento molecular permiten identificar el modo de unión que un ligando puede adoptar en una proteína y predecir la afinidad o energía de unión del complejo a través de una función de puntuación o *scoring*.<sup>56</sup> En este proyecto, se realizaron estudios de acoplamiento molecular dirigidos de CBZ y DEF al sitio de los bencimidazoles en los modelos de heterodímero de tubulina de *B. cinerea* BcABT<sub>WT</sub> y BcABT<sub>E198</sub>. El CBZ fue acoplado tanto en BcABT<sub>WT</sub> como BcABT<sub>E198</sub>, mientras que DEF fue estudiado únicamente en el modelo mutante. Como se mencionó anteriormente, se eligió el sitio de los bencimidazoles para la evaluación debido a que existe información cristalográfica de la tubulina co-cristalizada con un derivado de bencimidazol-2-carbamato de metilo (i.e., NZO), mismo grupo al que pertenece CBZ, y debido a que todos los residuos con mutaciones de resistencia reportadas componen a este sitio (i.e., E198 y F200). Este sitio está localizado en la subunidad  $\beta$ -tubulina de los microtúbulos, cerca de la interfase del heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina.

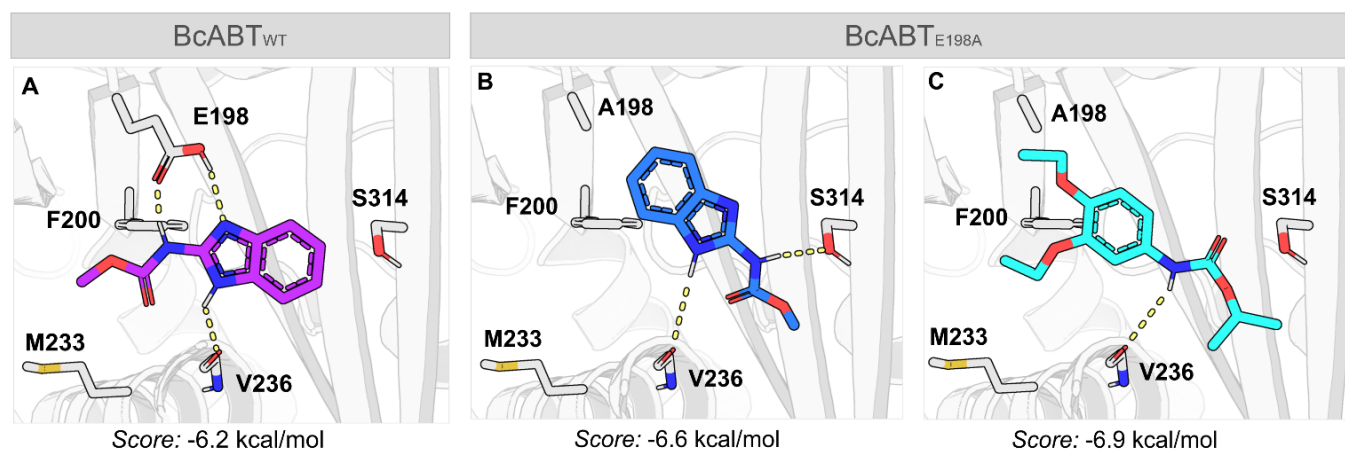
Para los tres casos, se seleccionaron los complejos proteína-ligando provenientes de Autodock Vina, debido a que el modo de unión obtenido para el CBZ en BcABT<sub>WT</sub> fue muy similar al que presenta el NZO en la estructura de referencia (**Figura 7.2.1**) esto, reflejado en el valor RMSD obtenido con ayuda del servidor *DockRMSD*<sup>57</sup> igual a 0.526 Å. Cabe mencionar que el cálculo de este valor se realizó considerando únicamente el núcleo de bencimidazol-2-carbamato de metilo de ambos compuestos.



**Figura 7.2.1.** Comparación entre el modo de unión de CBZ en BcABT<sub>WT</sub> obtenido de Autodock Vina y la estructura NZO co-cristalizado en la estructura de referencia (5CA1).



En la **Figura 7.2.2**, se muestran los resultados de los diferentes acoplamientos realizados con AMDock v1.6.2.<sup>37</sup>. En el caso de CBZ con el modelo BcABT<sub>WT</sub>, podemos observar la formación de interacciones de puente de hidrogeno del núcleo de bencimidazol con los residuos E198 y V236. Este perfil de interacción concuerda con la información cristalográfica previa (ver **Figura 7.2.1**).<sup>15,58</sup> Por su parte, los acoplamientos de CBZ y DEF en el modelo BcABT<sub>E198A</sub> muestran que la orientación de las regiones hidrofóbicas, tanto la región bencenoide de CBZ como los sustituyentes etiloxi en DEF se orientan hacia el residuo A198, el cual genera un ambiente más hidrofóbico en comparación al que existe cuando está presente el residuo E198. Este modo de unión, en el caso de CBZ, permite la formación de puentes de hidrogeno con los residuos V236 y S314, mientras que, en DEF se observa la formación de un único puente de hidrógeno con el residuo V236. Cabe mencionar que el acoplamiento de DEF en el modelo BcABT<sub>WT</sub> forma una interacción también con este residuo; sin embargo, la información experimental establece que este ligando no interactúa con la forma silvestre de la tubulina, por lo que no puede continuarse con el estudio de este complejo (**Figura A3** del Anexo). En la **Figura 7.2.2** se muestra además el puntaje o score obtenidos para cada caso, los cuales sugieren que los tres compuestos presentan una energía libre de unión similar por este blanco terapéutico. Resulta interesante observar que la puntuación predicha para CBZ en BcABT<sub>E198</sub> es más favorable que en el modelo silvestre. La posible inconsistencia con la información experimental de esto último se resolverá más adelante en el trabajo.



**Figura 7.2.2.** Resultados de acoplamiento molecular de **A)** CBZ en BcABT<sub>WT</sub> y **B)** BcABT<sub>E198A</sub> y **C)** DEF en BcABT<sub>E198A</sub>. Se muestra debajo de cada figura el valor de energía libre de unión predicha para cada sistema.

En general, estos estudios permitieron caracterizar el perfil de interacciones de los complejos proteína-ligando, pero, como sabemos, estos sistemas no son estáticos, por lo que se debe caracterizar el perfil dinámico de los complejos proteína-ligando a través del tiempo.

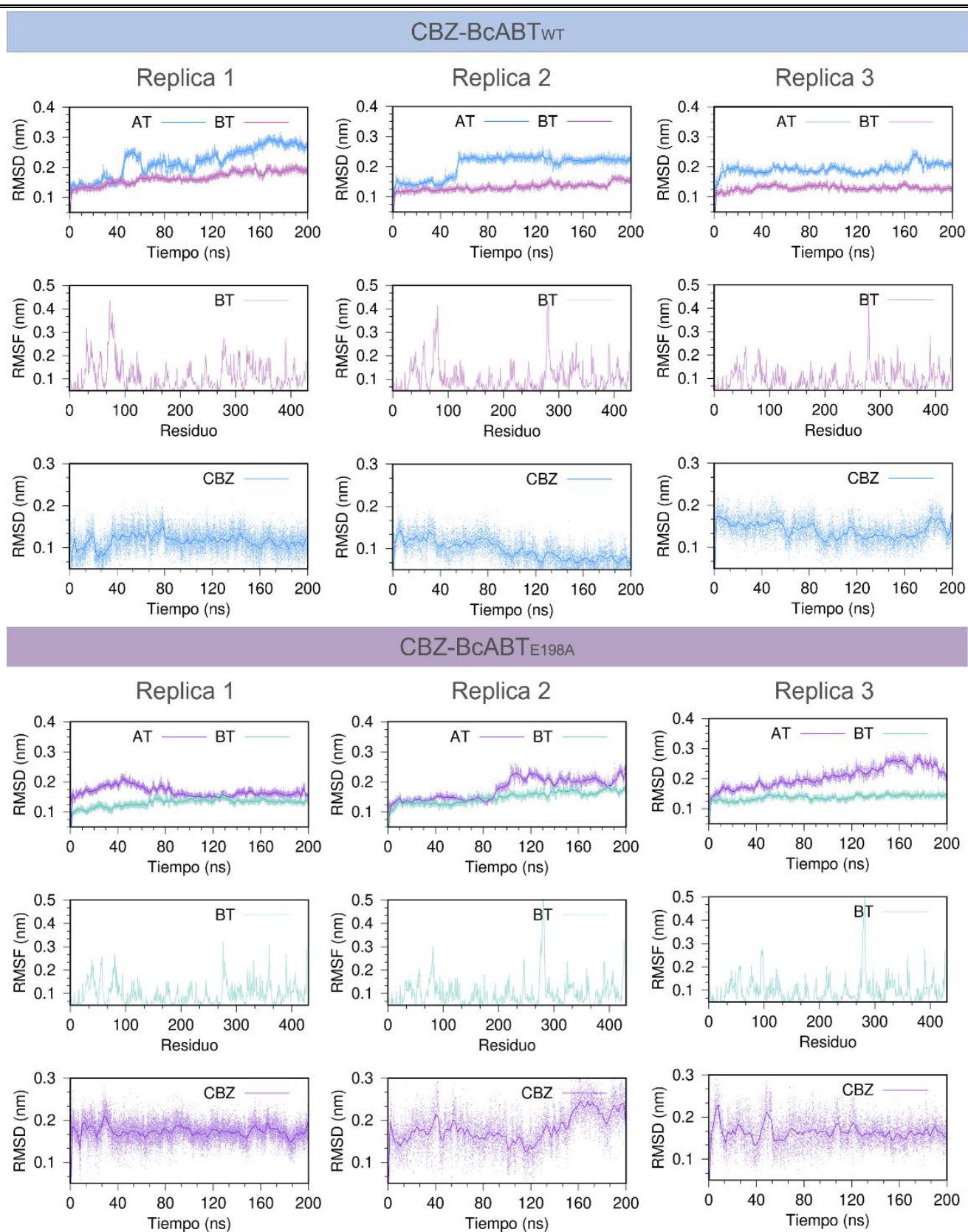
### **VII.3. Dinámica molecular**

Los estudios de dinámica molecular permiten predecir el movimiento de los átomos de un sistema en función del tiempo mediante ecuaciones de movimiento de Newton,<sup>59,60</sup> lo que permite estudiar la estabilidad de los complejos proteína-ligando y los cambios en su perfil de interacción en un tiempo determinado. Por lo anterior, llevamos a cabo simulaciones de dinámica molecular de 200 ns por triplicado de los sistemas DEF-BcABT<sub>E198A</sub>, CBZ-BcABT<sub>WT</sub> y CBZ-BcABT<sub>E198A</sub>. Para cada réplica, se realizó un análisis de RMSD (*root-mean-square deviation*) y RMSF (*root-mean-square fluctuation*) tomando los 200 ns de la simulación, mientras que, para el análisis de grupos, interacciones de puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas se analizaron en conjunto los últimos 100 ns de las tres réplicas.

#### *VII.3.1. Estabilidad de los complejos proteína-ligando a través del tiempo*

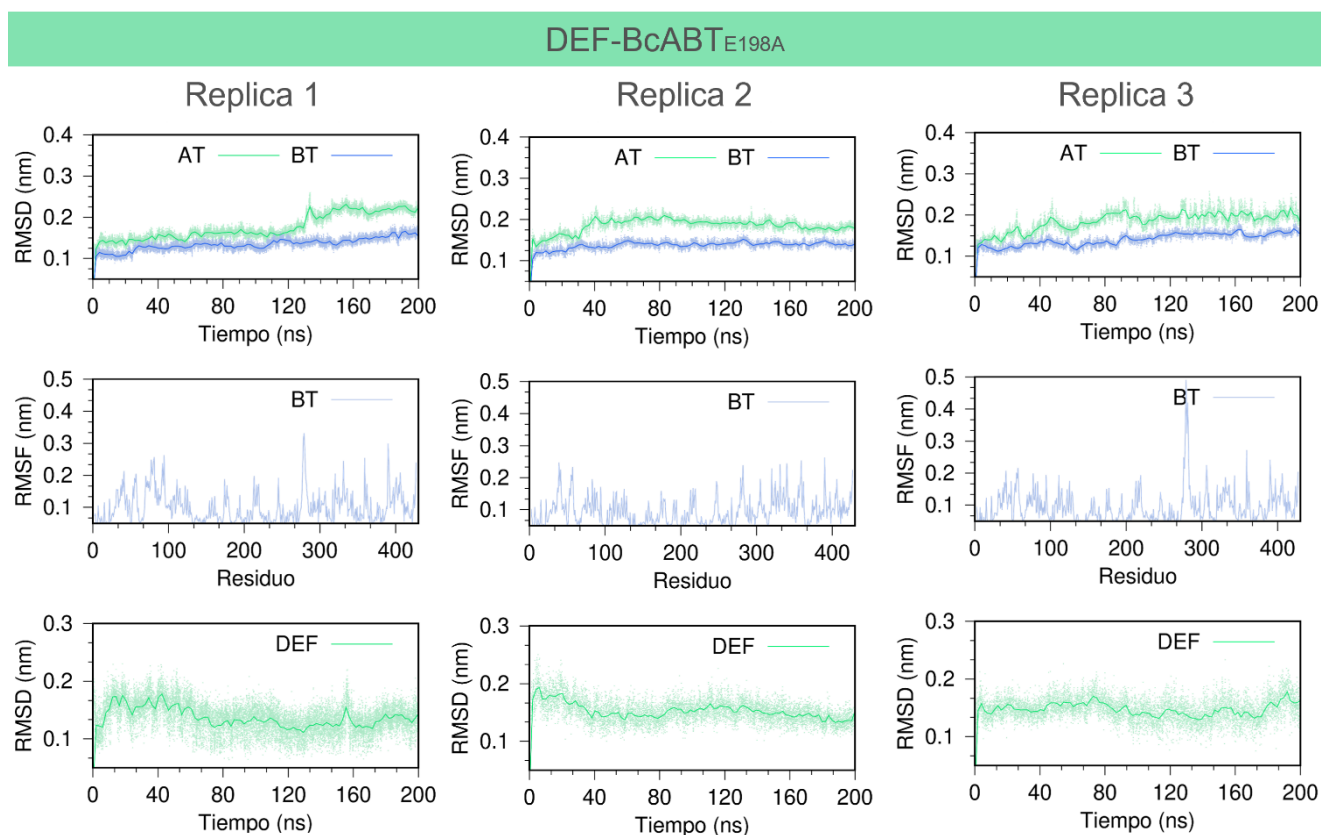
Para estudiar la estabilidad de nuestros sistemas durante los 200 ns de simulación, utilizamos las medidas de fluctuación estructural RMSD y RMSF. Estos parámetros nos permiten evaluar el desplazamiento promedio de los átomos durante la simulación en relación con una estructura de referencia, en este caso, su posición original en el tiempo cero y la flexibilidad de los residuos individuales, respectivamente.<sup>61,62</sup>

En la **Figura 7.3.1**, se muestran los resultados obtenidos para CBZ donde, tanto en la forma silvestre como en la mutante, se muestra el RMSD de cada subunidad del heterodímero de tubulina, así como los valores de RMSF únicamente de la subunidad  $\beta$ . En el RMSD se aprecia que la subunidad  $\alpha$  es la que presenta mayor movilidad en comparación con la subunidad  $\beta$ -tubulina. Podemos observar fluctuaciones menores a 0.3 nm en ambas subunidades, por lo que consideramos a la proteína estable durante la simulación. En el caso de RMSF, vemos una mayor movilidad cerca de los residuos 100 y 300. En ambos casos, tratándose de la proteína, las fluctuaciones que se llegan a apreciar en los sistemas podemos atribuir las a la movilidad intrínseca de los aminoácidos más externos o a aquellos que conforman asas (*loops*) y regiones terminales.



**Figura 7.3.1.** Análisis de fluctuación estructural RMSD y RMSF de CBZ en el heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina en la forma **A)** silvestre y **B)** mutante. AT:  $\alpha$ -tubulina; BT:  $\beta$ -tubulina.

En cuanto a la estabilidad del ligando, observamos que el cambio respecto a su posición original es inferior a 0.2 nm (2.0 Å) en ambos sistemas y, además, la fluctuación de estos durante la simulación es mínima en las tres replicas realizadas. Esto puede deberse a que estructuralmente el CBZ tiene baja entropía conformacional debido a que la región del anillo de bencimidazol restringe el movimiento. Adicionalmente, las interacciones de puente de hidrogeno, como la que se observa con los residuos E198 y V236 en el sistema CBZ-BcABT<sub>WT</sub> y con V236 en el sistema CBZ-BcABT<sub>E198A</sub>, así como las interacciones hidrofóbicas, contribuyen significativamente a que el ligando se mantenga estable en el sitio. Comparando ambos sistemas, notamos que existe una pequeña diferencia en las fluctuaciones entre los modelos silvestre y mutante, observándose que la fluctuación es mayor en la forma mutante. Esto último se puede explicar por la pérdida de interacción de puente de hidrógeno con E198, lo que reduce significativamente la estabilidad del ligando en el sitio. Además, esto explicaría la importancia de este residuo en la unión del ligando y la resistencia al mismo debido a su sustitución por alanina.



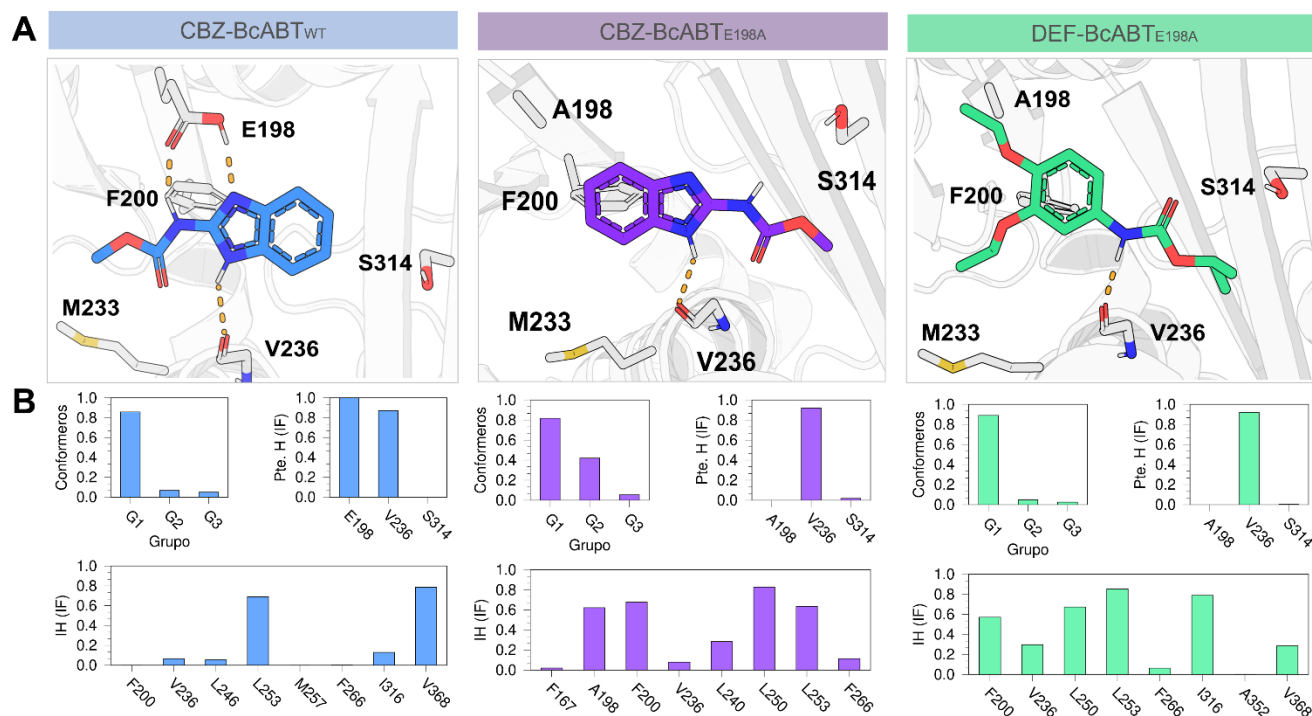
**Figura 7.3.2.** Análisis de fluctuación estructural RMSD y RMSF de DEF en el heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina en su forma mutante.

En el caso de la **Figura 7.3.2**, correspondiente al DEF en la forma mutante, observamos que tanto el ligando como las dos subunidades de la tubulina presentan mínimas fluctuaciones a lo largo de la simulación. En este caso, DEF presenta sustituyentes con más grados de libertad, debido a los sustituyentes de etiloxi en el benceno y el grupo isopropilo en la región del carbamato. A pesar de ello, el ligando se mantuvo bastante estable en el sitio de unión con un RMSD menor a 0.2 nm. En el caso de la proteína, la subunidad  $\alpha$ -tubulina fue la que presentó mayor movilidad.

### VII.3.2. Caracterización dinámica de CBZ y DEF en el sitio de los bencimidazoles

Parte importante de los estudios de dinámica molecular es el análisis de los cambios en el perfil de interacción del ligando en el sitio de unión a través del tiempo. En el panel **A)** de la **Figura 7.3.3**, se muestra el modo de unión más representativo de cada ligando obtenido a partir del análisis por grupos de las tres réplicas de simulación. En el caso de CBZ en el modelo silvestre, el modo de unión más representativo del grupo 1 (G1) resultó ser muy similar al obtenido en el acoplamiento molecular. Es importante mencionar que para el análisis por grupos se estableció un valor de *cutoff* de 0.2 nm, que corresponde al movimiento umbral para que distintas conformaciones pertenezcan al mismo grupo. El CBZ mostró interacciones de puente de hidrógeno con la cadena lateral de E198 y la cadena principal de V236 a lo largo de las simulaciones, interacciones de importancia para la actividad biológica de este compuesto. Esto se confirma con el gráfico de frecuencia de formación de puente de hidrógeno, en donde podemos observar que la interacción con ambos residuos se presentó durante más del 80% de las simulaciones. Cabe aclarar que la formación de puente de hidrógeno con el residuo E198 puede corresponder al que se forma entre el grupo carbonilo del residuo y la región del carbamato, o al del ácido de este mismo con el imidazol del bencimidazol. En cuanto a las interacciones hidrofóbicas, son menos abundantes respecto a los demás sistemas, presentándose únicamente este tipo de interacción con los residuos L253 y V368 durante la simulación. En cuanto al CBZ en el modelo mutante, el análisis de grupos mostro dos conformaciones predominantes, a pesar de ello, se muestra aquella que fue más representativa. Este modo de unión permite la formación de un puente de hidrogeno con la cadena principal V236 durante gran parte de las trayectorias. A diferencia del modo de unión obtenido durante el acoplamiento molecular, en estas simulaciones se observa la pérdida de interacción de puente de hidrógeno con el residuo S314. Esto último podría explicar el aumento en la movilidad del ligando observado en las tres réplicas de la simulación. Por otra parte, el

análisis de interacciones hidrofóbicas sugiere el aumento de estas al interactuar A198, F200, L240, L250 y L253, principalmente. Aunque estas interacciones hidrofóbicas contribuyen en la afinidad del ligando por el sitio, se requiere determinar si la unión del ligando podría estar limitada por un proceso cinético en lugar de termodinámico.



**Figura 7.3.3.** Análisis en conjunto de las réplicas de CBZ y DEF en BcABT. En el panel **A)** se muestra el modo de unión más representativo de cada ligando en su proteína. En **B)** se muestra el análisis de grupos, frecuencia de interacciones de puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.

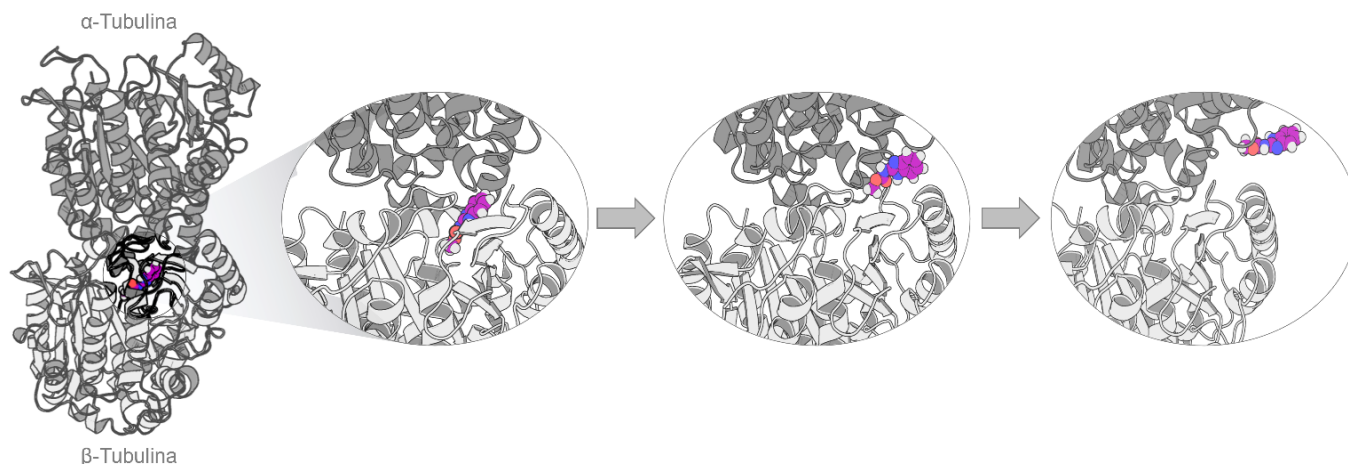
Finalmente, en el caso de DEF, el análisis de las simulaciones de dinámica molecular mostró una predilección por el modo de unión obtenido durante el acoplamiento molecular. El ligando mantuvo interacción de puente de hidrógeno con V236 durante más del 80% de las simulaciones. En cuanto a las interacciones hidrofóbicas, se observa que predominan los contactos con F200, V236, L250, L253 e I316, en conjunto, contribuyendo con la estabilidad del ligando en el sitio propuesto.

#### VII.4. Tiempo de residencia ( $\tau$ RAMD)

Los estudios de acoplamiento molecular previos muestran a través de los valores de energía libre de unión que ambos ligandos presentan afinidad termodinámica por el blanco terapéutico. Adicionalmente, los estudios de dinámica molecular muestran resultados favorables en cuanto al perfil de interacción y la estabilidad de los ligandos en el sitio propuesto. Sin embargo, es

importante considerar la contribución cinética debido a que de igual manera tiene importancia en la eficacia y seguridad de los fármacos. En este proyecto, empleamos la metodología de  $\tau$ RAMD, la cual nos permite predecir el tiempo de residencia ( $T_R$ ) y proporcionar información sobre los mecanismos de disociación proteína-ligando.<sup>44,63</sup>

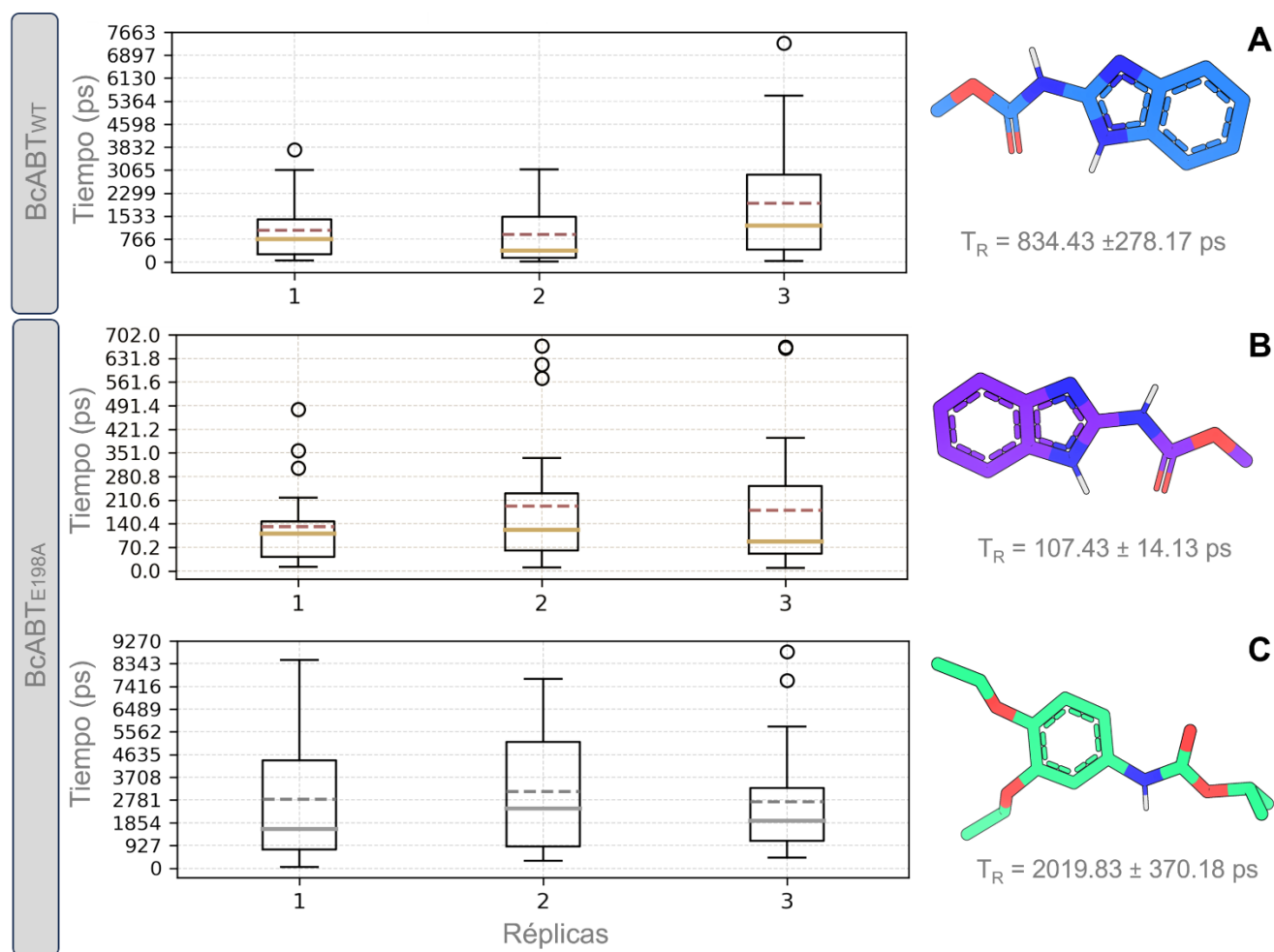
Para ello, se aplicó una fuerza al centro de masa del ligando de  $10 \frac{kcal}{mol \text{ \AA}}$  y se estableció que la dirección de ésta se reasignaría aleatoriamente cuando el movimiento del ligando en un tiempo determinado (50 pasos) estuviera por debajo de 0.0025 nm, debido a que los posibles impedimentos estéricos dentro del sistema pueden afectar su salida del sitio y por consiguiente los tiempos obtenidos. Adicionalmente, se estableció el término de la trayectoria después de 40 ns o cuando el ligando se encuentre a 40 nm de su posición original, asegurando con esto su extracción del sitio. En la **Figura 7.6** se muestra la representación esquemática del proceso de disociación del CBZ de la tubulina.



**Figura 7.4.1.** Representación del proceso de disociación de CBZ del sitio de unión propuesto en el heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina.

Es este trabajo, se determinó el  $T_R$  de CBZ en ambos modelos de la proteína, mientras que para DEF se empleó el modelo BcABT<sub>E198A</sub>. De las 5 réplicas que comprendían 20 trayectorias de disociación, se seleccionaron las 3 que presentaban menor variación entre ellas por medio de un análisis de *T-student*, debido a que en algunas de las réplicas los valores obtenidos presentaban gran fluctuación, lo que pudo deberse a la interacción transitoria del ligando en la interfaz del heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina. En este sentido, en la **Figura 7.4.2** se presentan los resultados obtenidos para esta determinación. En el caso del CBZ, obtuvimos un  $T_R$  de 834.43 ps en el modelo BcABT<sub>WT</sub>, mientras que en el modelo BcABT<sub>E198A</sub> un tiempo de 107.43 ps. Por su parte, para DEF, el tiempo obtenido en el modelo BcABT<sub>E198A</sub> fue de 2019.83 ps. Los

resultados del análisis estadístico *Ks test* para estos valores se muestra en las **Figuras A4 y A5** del anexo. Estos resultados concuerdan con lo esperado, debido a que como se mencionó en la sección anterior, estudios experimentales previos muestran una disminución en la actividad de CBZ frente a este hongo patógeno cuando ocurre la mutación de ácido glutámico a alanina en la posición 198, lo que podría explicarse con la diferencia en la afinidad cinética de CBZ en ambos sistemas, siendo superior en la forma silvestre. De igual manera, de acuerdo con el resultado obtenido para DEF, esto sugiere que presenta una mayor afinidad cinética por su blanco terapéutico que el mismo CBZ en la forma silvestre de la proteína.



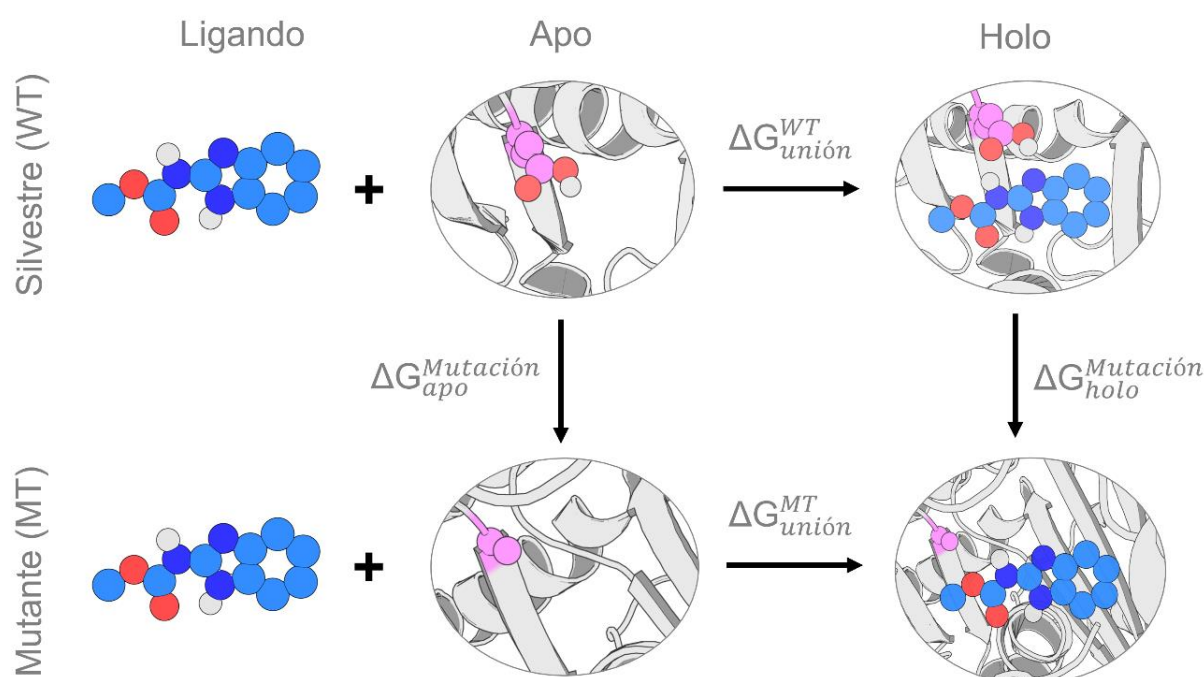
**Figura 7.4.2.** Resultados de la metodología de  $\tau$ RAMD. Se muestran los gráficos asociados a cada réplica y el valor de  $T_R$  obtenido en picosegundos para **A)** CBZ en BcABT<sub>WT</sub> **B)** CBZ y **C)** DEF en BcABT<sub>E198A</sub>.



## VII.5. Mutaciones que afectan la susceptibilidad a los fungicidas

### VII.5.1. Efecto de mutaciones en la afinidad de los ligandos

Como se mencionó anteriormente, se han reportado diferentes mutaciones que confieren diferentes grados de susceptibilidad al tratamiento con fungicidas, principalmente E198A/K/V y F200Y<sup>2</sup>. Para tratar de entender el efecto que tienen dichas mutaciones en la afinidad de CBZ y DEF por la  $\beta$ -tubulina de *B. cinerea*, empleamos métodos alquímicos para el cálculo de la doble diferencia de energía libre de unión ( $\Delta\Delta G_{unión}^{Mutación} = \Delta G_{holo}^{Mutación} - \Delta G_{apo}^{Mutación}$ ) implementados por Aldeghi y colaboradores.<sup>64</sup> En la **Figura 7.8** se muestra el ciclo termodinámico usado para estimar esta doble diferencia de energía de unión.

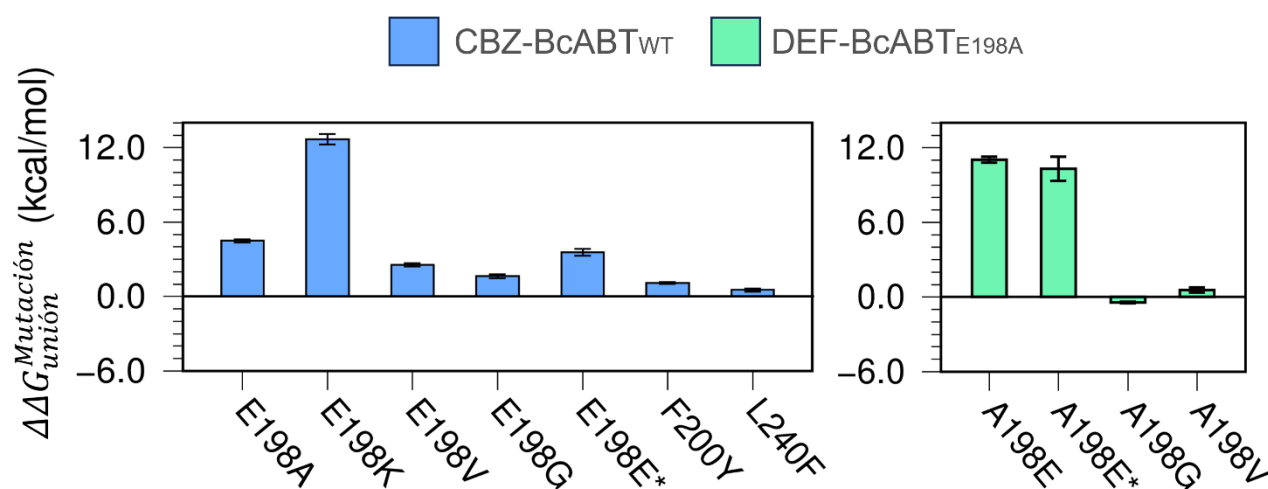


**Figura 7.5.1.** Ciclo termodinámico usado para el cálculo de la doble diferencia de energía ( $\Delta\Delta G_{unión}^{Mutación}$ ).

En este proyecto, se evaluaron un total de 8 mutaciones para el CBZ partiendo del modelo silvestre y 4 para el DEF partiendo del modelo mutante. Los valores predichos de  $\Delta\Delta G_{unión}^{Mutación}$  para ambos ligandos se muestran en los gráficos de la **Figura 7.5.2**, en donde un  $\Delta\Delta G_{unión}^{Mutación}$  positivo indica que la mutación conlleva a una disminución de la afinidad del ligando en el sitio de unión, mientras que un valor negativo sugiere que la mutación contribuye al aumento de la afinidad del ligando por dicho sitio. En el caso de CBZ, los valores predichos para las mutaciones sugieren que la sustitución de E198<sup>1,18</sup> disminuye la afinidad de CBZ en el sitio de

unión ( $\Delta\Delta G_{unión}^{Mutación} > 2.0$  kcal/mol), esto debido a la pérdida de interacciones de puente de hidrógeno con este residuo. Así mismo el cambio de E198 por un aminoácido cargado y de mayor tamaño, como la lisina<sup>65</sup>, disminuye significativamente la afinidad del ligando ( $\Delta\Delta G_{unión}^{Mutación} > 12.68$  kcal/mol). Resulta interesante notar que el cambio en el estado de protonación de la forma protonada de E198 por la cargada (E198\*) resulta en una disminución de la afinidad. Esto último confirma que la forma protonada de este residuo es indispensable para que el CBZ y otros derivados bencimidazólicos se unan al sitio de unión<sup>58</sup>. Por otra parte, las mutaciones F200Y y L240F<sup>2,18</sup>, las cuales alteran la susceptibilidad del hongo al tratamiento con CBZ, no muestran cambios significativos en la  $\Delta\Delta G_{unión}^{Mutación}$  ( $< 1.00$  kcal/mol). Lo anterior sugiere que estas mutaciones no tienen un efecto directo la afinidad del ligando, por lo que el mecanismo a través del cual generan resistencia puede ser por cambios en la estabilidad de la  $\beta$ -tubulina.

Por otro lado, el cambio de alanina por ácido glutámico en cualquiera de sus estados de protonación en la posición 198 resulta desfavorable en la afinidad de DEF por el sitio de unión ( $\Delta\Delta G_{unión}^{Mutación} > 10.00$  kcal/mol), confirmando la preferencia de este compuesto por la forma mutante E198A de la proteína<sup>16</sup>. Adicionalmente, las mutaciones en la misma posición por aminoácidos de carácter no polar, como glicina y valina, no producen cambios significativos en la afinidad del ligando de acuerdo con la  $\Delta\Delta G_{unión}^{Mutación}$  ( $\approx 0.00$  kcal/mol) obtenida. Esto último también es consistente con información experimental previa.<sup>20</sup>



**Figura 7.5.2.** Resultados obtenidos de  $\Delta\Delta G_{unión}^{Mutación}$  para CBZ y DEF por medio de la metodología de transmutación atómica. E\* corresponde al residuo E198 en su estado desprotonado.

VII.5.2. Efecto de mutaciones en la estabilidad de la proteína

En la sección anterior, evaluamos los cambios en la afinidad del ligando por el sitio de unión ocasionados por diferentes mutaciones. Sin embargo, la resistencia a los agentes inhibidores de la polimerización de los microtúbulos puede estar dada de igual manera por cambios en la estabilidad de la estructura.<sup>66,67</sup> En este sentido, las mutaciones F200Y y L240F mostraron no tener efecto en la afinidad de CBZ, por lo que en esta sección evaluamos el efecto que tienen en la estabilidad de la proteína por medio de diferentes servidores en línea. Estos servidores permitieron determinar el  $\Delta\Delta G_{\text{plegamiento}}^{\text{Mutación}}$ , lo cual permite determinar si las mutaciones afectan la estabilidad de la proteína y/o flexibilidad de esta, derivando así en resistencia al tratamiento con agentes fungicidas. En la **Tabla 7.5.1** se muestran los resultados de  $\Delta\Delta G_{\text{plegamiento}}^{\text{Mutación}}$  para cada mutación. En este sentido, los resultados de DynaMut sugieren que ambas mutaciones tienen un efecto estabilizante en la proteína, lo que puede ocasionar una disminución de la flexibilidad e interferir con la apertura del sitio crítico, dificultando así el ingreso del ligando al sitio de unión. De manera contraria a lo observado con DynaMut, los valores obtenidos de  $\Delta\Delta G_{\text{plegamiento}}^{\text{Mutación}}$  en el resto de los servidores empleados sugieren que ambas mutaciones tienen un efecto desestabilizante en la proteína, esto ocasionaría un incremento en la flexibilidad de los residuos que componen el sitio de unión propuesto. Este aumento del comportamiento dinámico de la proteína permitiría el ingreso del ligando en el sitio, pero, debido a la alta movilidad, este no sería estable.

**Tabla 7.5.1.** Resultados de  $\Delta\Delta G_{\text{plegamiento}}^{\text{Mutación}}$  obtenidos para las mutaciones F200Y y L240F

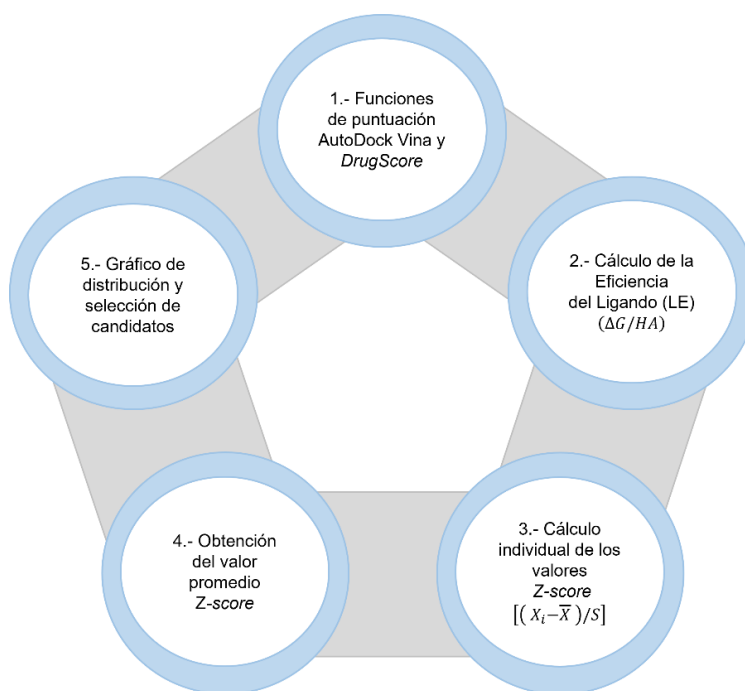
| $\Delta\Delta G_{\text{plegamiento}}^{\text{Mutación}}$ (kcal/mol) |         |        |        |        |        |         |        |        |
|--|---------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| Mutación   | DynaMut | ENCoM  | mCSM   | SDM    | DUET   | INPS-3D | MUpro  | PremPS |
| F200Y  | 0.548   | -0.009 | -0.563 | -0.760 | -0.344 | -0.290  | -0.983 | 0.91   |
| Criterio   | E       | D      | D      | D      | D      | D       | D      | D      |
| L240F  | 0.855   | 0.457  | -1.664 | -1.39  | -1.92  | -0.938  | -1.033 | 1.16   |
| Criterio   | E       | E      | D      | D      | D      | D       | D      | D      |

Notas: Estabilizadora (E), Desestabilizadora (D).

Debido a que predominantemente los resultados nos indican que ambas mutaciones desestabilizan la estructura, podemos suponer que la resistencia a los inhibidores de la polimerización ocasionada por estas mutaciones sigue el mecanismo de cambios en la estabilidad de la  $\beta$ -tubulina.

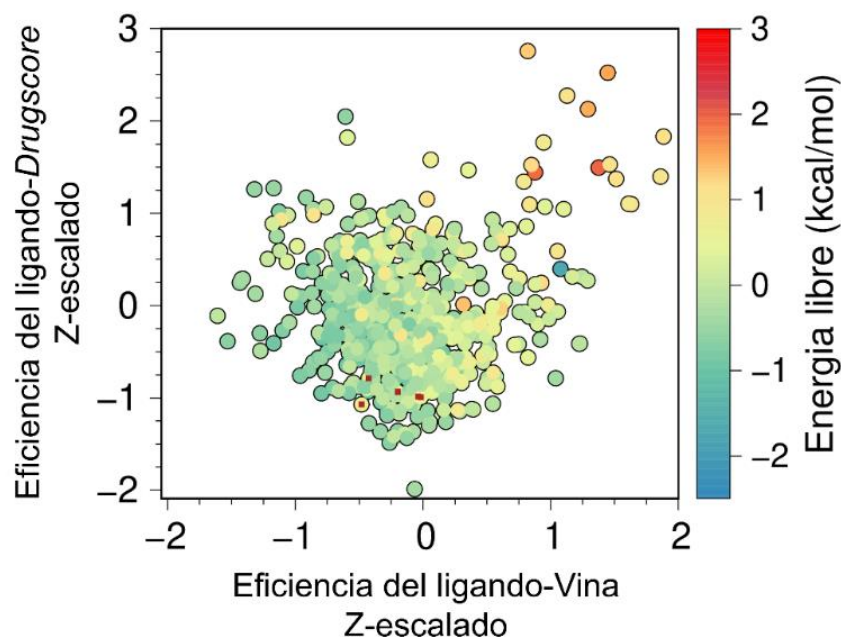
## VII.6. Cribado virtual

Finalmente, y de manera complementaria, realizamos un cribado virtual o *virtual screening* (VS) con el objetivo de proponer diferentes estructuras como punto de partida para un posterior diseño racional de nuevas moléculas con actividad fungicida. Para ello, recopilamos 635 análogos estructurales de DEF de la base de datos PubChem, para posteriormente llevar a cabo estudios de acoplamiento molecular convencionales en ambos modelos de la proteína con AutoDock Vina. Para la selección de los candidatos, empleamos la función de consenso *Z-score*<sup>68</sup> para comparar los resultados de las funciones de puntuación AutoDock Vina y *DrugScore*.<sup>69</sup> De manera inicial, con los valores de energía libre de unión obtenidos de ambas funciones, se llevó a cabo el cálculo eficiencia del ligando (EL), obtenido al dividir cada valor de energía libre entre la cantidad de átomos pesados o *heavy átomos (HA)*, esto con el objetivo de desestimar valores de *score* superiores asociados al tamaño molecular. Posteriormente, llevamos a cabo el cálculo de *Z-score*, restando a cada valor individual de EL el valor promedio de los datos y dividiéndolo entre su desviación estándar, esto se realizó para todos los valores de cada una de las funciones utilizadas. Finalmente, para agrupar los datos, obtenemos el promedio de ambas funciones y realizamos un gráfico de distribución. En el **Esquema 7.6.1**, se resume el proceso antes mencionado.



**Esquema 7.6.1.** Secuencia de pasos a seguir para la selección de candidato.

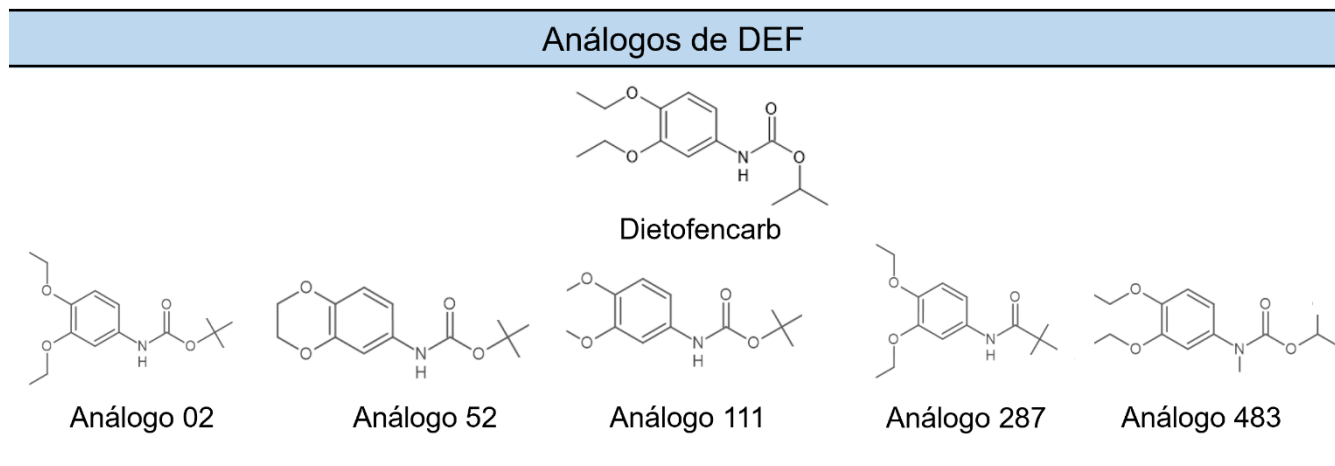
A partir de los valores individuales de Z-score para los análogos en el modelo BcABT<sub>E198A</sub>, y los valores promedio de Z-score obtenidos en el modelo BcABT<sub>WT</sub> generamos el Gráfico de distribución de la **Figura 7.6.1**, en donde la gama de colores se resalta aquellos ligandos que presentan un valor de energía libre de unión más favorable. En este sentido, se seleccionaron los 5 compuestos que presentaron mayor afinidad por la proteína en forma mutante y que, adicionalmente, su unión en la forma silvestre no se ve favorecida, asemejando un comportamiento similar al que tiene DEF, los cuales corresponden a los puntos en rojo resaltados dentro del diagrama.



**Figura 7.6.1.** Gráfico de distribución de los análogos de DEF. Se gráfica en función del valor Z escalado de la eficiencia del ligando de las dos funciones de puntuación empleadas.

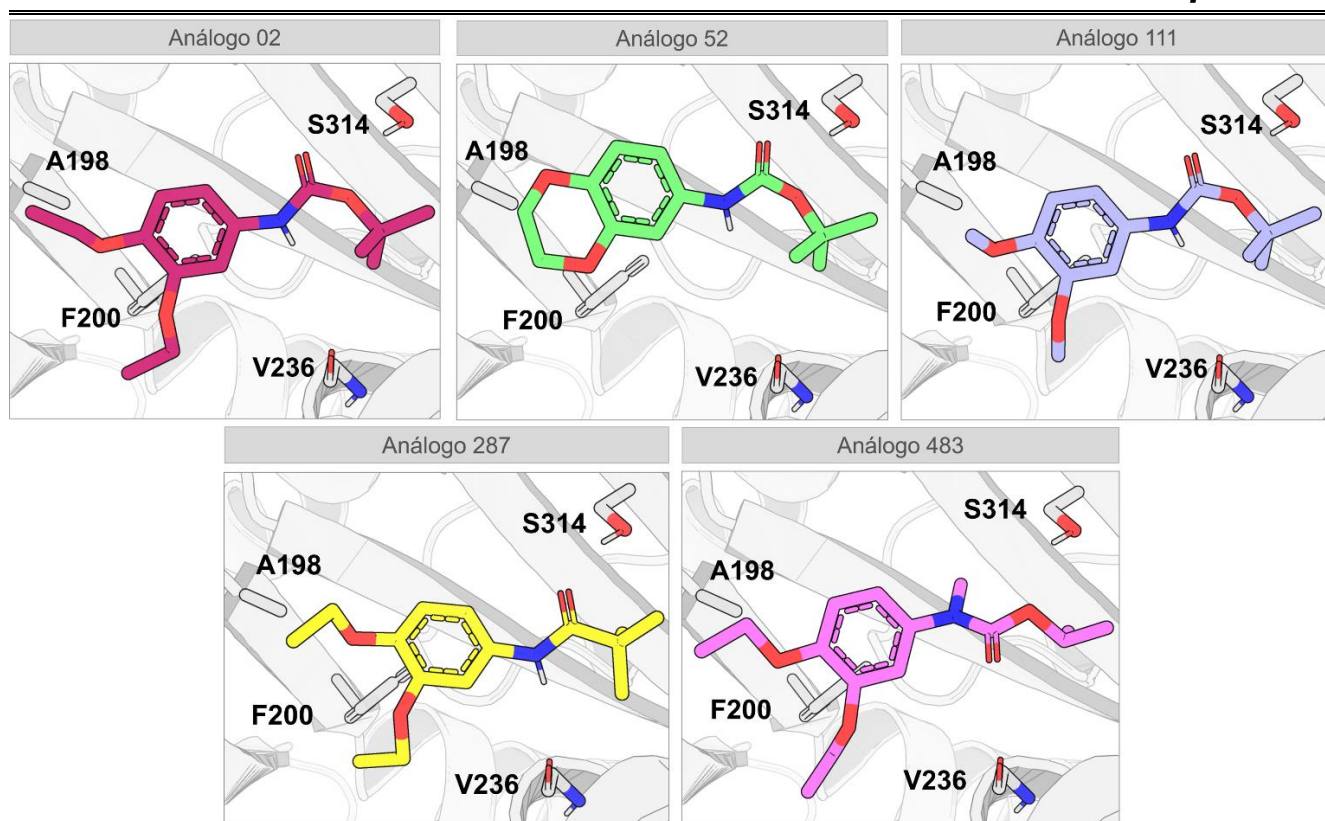
Los 5 compuestos seleccionados corresponden a los análogos 02, 52, 111, 287 y 483, cuya estructura química y modo de unión en la proteína mutante se observan en la **Figura 7.6.2 y Figura 7.6.3** respectivamente. En cuanto a los cambios estructurales de los análogos respecto a DEF, podemos observar una extensión de la estructura en la región del carbamato para la formación del grupo *ter*-butilo, observándose esto en todos los análogos, excepto en el 483. En este último, ocurre una alquilación en el átomo de nitrógeno del grupo carbamato. Por otra parte, el grupo carbamato se mantiene en los diferentes análogos, salvo en el análogo 287, donde se observa una reducción de la estructura por la remoción del átomo de oxígeno. El análogo 111, sufre una reducción de la estructura, en donde se eliminan dos grupos metileno

en la región de los éteres, mientras que en el análogo 52 ocurre un cierre de anillo en esa misma región.



**Figura 7.6.2.** Estructura química de los diferentes análogos de DEF.

Debido a la alta similitud estructural que presentan los compuestos con DEF, se observa un modo de unión similar al de este compuesto de referencia, donde la región de las cadenas alquílicas y el anillo aromático se orienta en dirección al residuo A198. Cabe mencionar que, en este caso, en ninguno de los compuestos se observa la formación de interacciones de puente de hidrogeno como con DEF y CBZ. A excepción del análogo 287, en todos los casos la orientación del nitrógeno donador de puente de hidrógeno no permite la interacción con la cadena principal de la V236 debido a que el ángulo y distancia entre los átomos involucrados no son los adecuados. Recordemos que para la formación de puentes de hidrógeno el ángulo de interacción debe ser mayor a  $150^\circ$ , con una distancia entre donador y aceptor de entre de 2 y 4 Å. En este caso, las contribuciones energéticas se deben principalmente a interacciones de tipo hidrofóbicas.



**Figura 7.6.3.** Resultados de acoplamiento molecular para los 5 análogos seleccionados del cribado virtual.

Como se mencionó anteriormente, únicamente se proponen estructuras como punto de partida para un diseño racional, ya que para continuar con estudios de diseño se requeriría un análisis a mayor profundidad del perfil de interacción de los análogos propuestos, así como estudios de dinámica molecular que permitan un mayor entendimiento del comportamiento de estos compuestos en la tubulina.

---

## VIII. CONCLUSIONES

El presente trabajo proporcionó información valiosa con relación al perfil de interacción de los fungicidas CBZ y DEF en la  $\beta$ -tubulina de *B. cinerea*.

- A través del análisis de secuencias y modelado por homología, fue posible la construcción del modelo tridimensional de  $\alpha/\beta$ -tubulina, el cual cumple con los parámetros de evaluación local y global para su validación.
- Los estudios de acoplamiento molecular permitieron determinar el modo de unión de CBZ y DEF en la  $\beta$ -tubulina de *B. cinerea*.
- Con los estudios de dinámica molecular fue posible caracterizar el comportamiento dinámico de los sistemas a través del tiempo, revelando que estos son estables y que, además, las interacciones por parte del CBZ con los residuos E198 y V236 son importantes para su actividad biológica. Por otro lado, en el caso de DEF, el puente de hidrógeno con la cadena principal de V236 se presenta a lo largo de la simulación y la ausencia de E198 en el modelo evaluado permite una mejor orientación de las regiones hidrofóbicas en la cavidad hidrofóbica.
- El estudio cinético con  $\tau$ RAMD reveló una mayor selectividad cinética de CBZ en la forma silvestre sobre la mutante, por lo que la resistencia provocada por la mutación E198A puede deberse a esta diferencia. En el caso de DEF, el tiempo de residencia obtenido es superior al de CBZ en el mismo modelo.
- El cálculo de la doble diferencia de energía libre de unión a través de estudios de transmutación atómica confirma los resultados experimentales reportados, en donde la sustitución del residuo E198 tiene un efecto significativo en la afinidad de CBZ debido a la pérdida de las interacciones de puente de hidrogeno. Por otro lado, DEF tiene una mayor preferencia por el sitio de unión propuesto cuando está presente la mutación E198A. Adicionalmente, los nuestros resultados sugieren que las mutaciones F200Y y L240F tienen un efecto en la estabilidad de la estructura, lo que puede conducir a resistencia hacia los agentes inhibidores la polimerización.
- Finalmente, por medio de cribado virtual fue posible identificar 5 potenciales análogos estructurales de DEF con perfil de interacción similar a este compuesto, los cuales pueden servir como punto de partida para el futuro diseño de nuevos compuestos fungicidas.



## **IX. PERSPECTIVAS**

Profundizar en el estudio de análogos de DEF para comprender el perfil de interacción de los candidatos, así como de su comportamiento dinámico a través de estudios de dinámica molecular.

Por medio del conocimiento generado, realizar la propuesta y diseño de nuevos compuestos con mayor actividad fungicida contra *B. cinerea*.

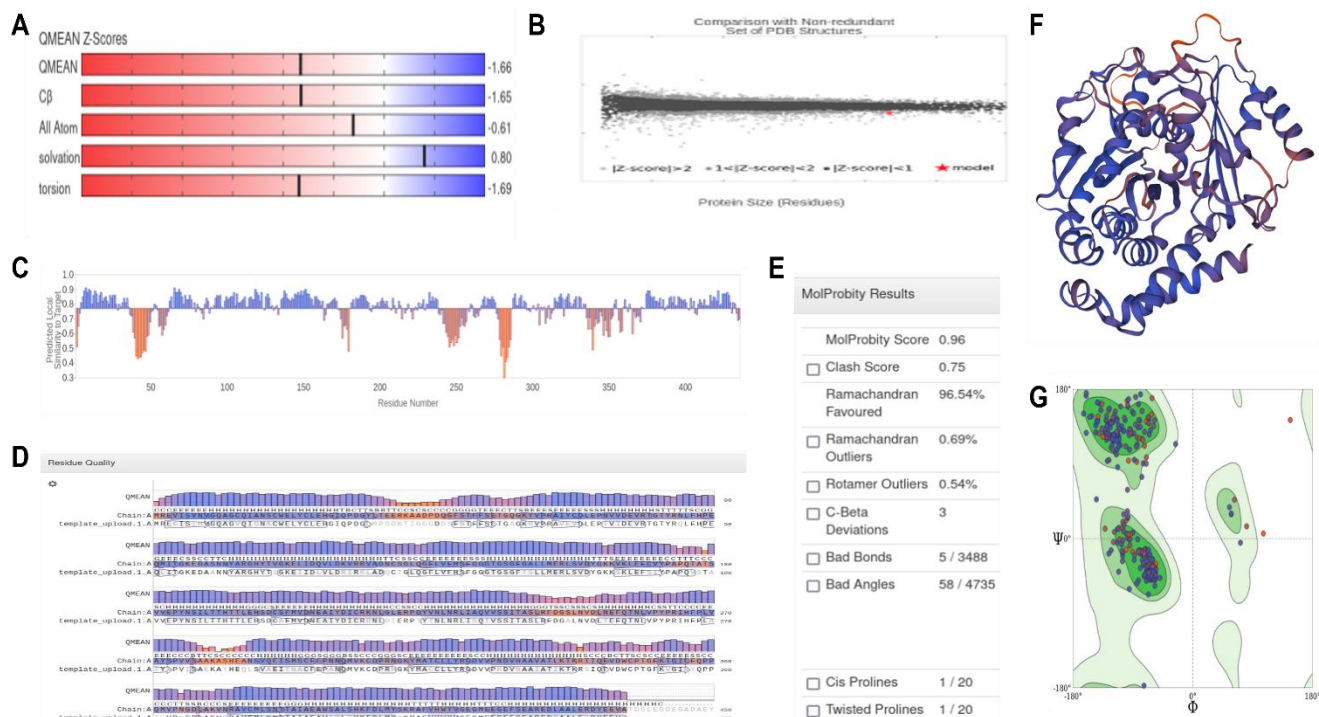
X. APÉNDICE

**Tabla A1.** Resultados del alineamiento de secuencias depositadas de *B. cinerea* respecto a la de referencia *Sus barbatus*

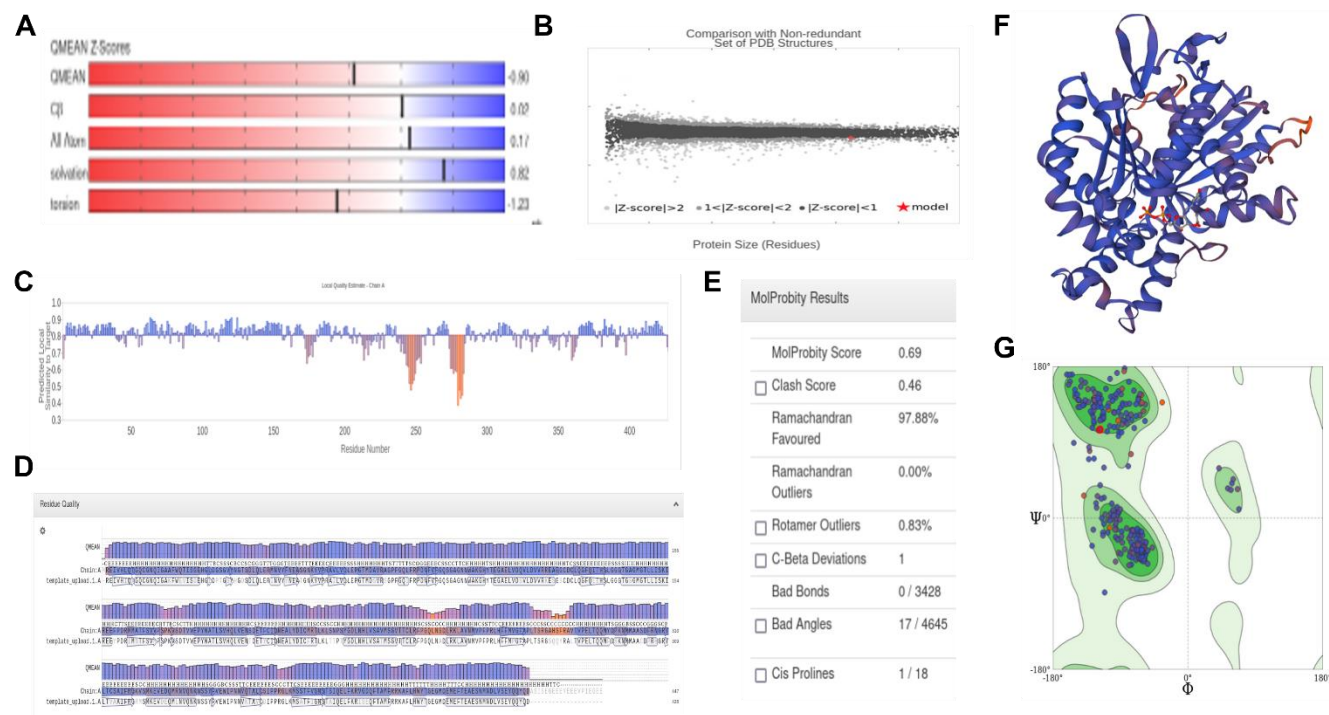
| Porcentaje de identidad (%) |                     |
|-----------------------------|---------------------|
| <i>Botrytis cinerea</i>     | <i>Sus barbatus</i> |
| <b>Uniprot ID</b>           | A0A0R4I993          |
| M7TZP0                      | 68.93               |
| A0A384J8T3                  | 68.93               |
| G2Y7B3                      | 68.93               |
| A0A384J7P6                  | 77.78               |
| G2Y6Z3                      | 77.78               |
| M7TU84                      | 77.78               |

**Tabla A2.** Resultados del alineamiento entre de secuencias de *B. cinerea*

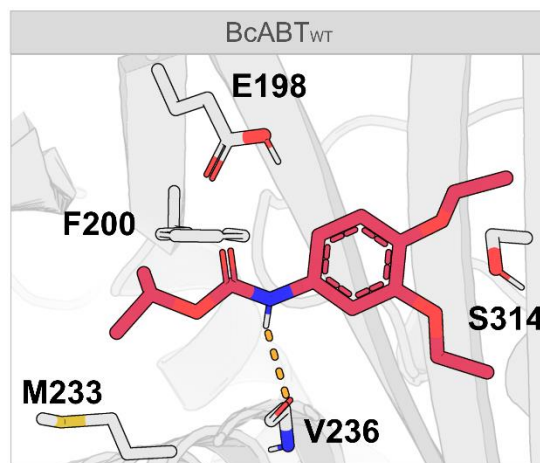
|            | A0A384J7P6 | G2Y6Z3  | M7TU84  |
|------------|------------|---------|---------|
| A0A384J7P6 | 100.00%    | 100.00% | 100.00% |
| G2Y6Z3     | 100.00%    | 100.00% | 100.00% |
| M7TU84     | 100.00%    | 100.00% | 100.00% |



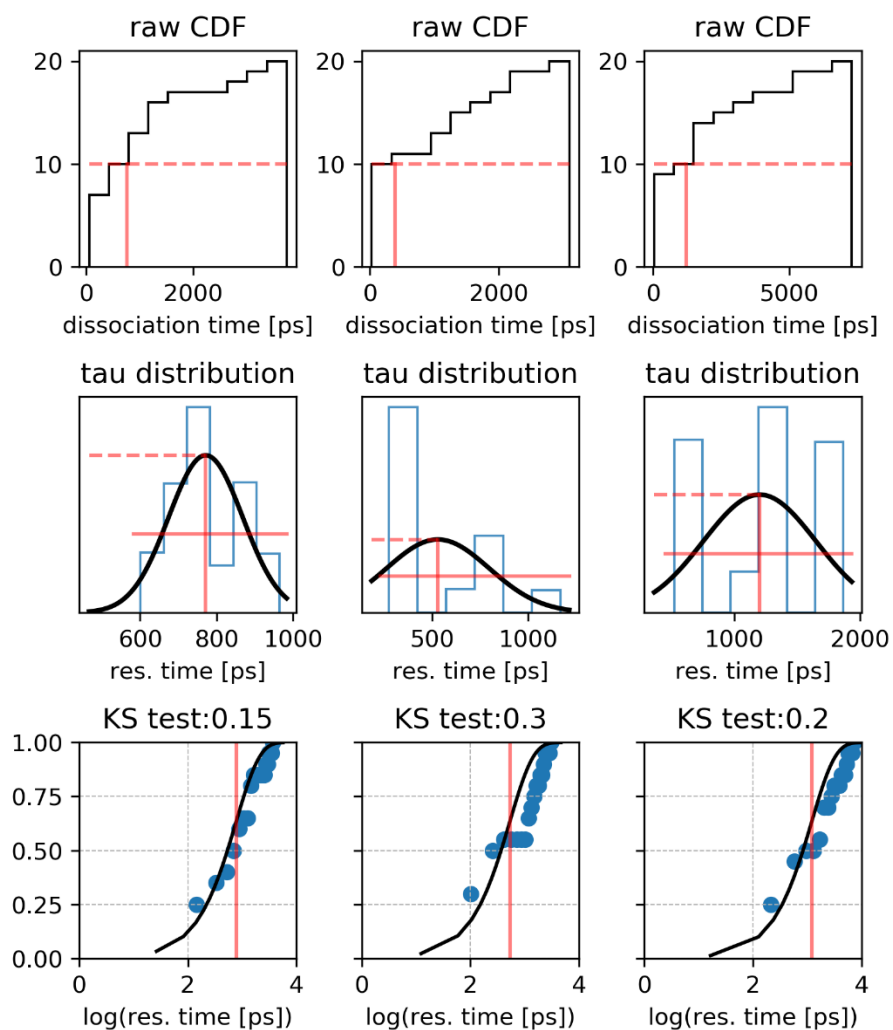
**Figura A1. Evaluación local y global del modelo  $\alpha$ -tubulina de *B. cinerea* obtenido de SwissModel. A) Puntaje Q-MEAN; B) Distribución normalizada del puntaje Q-MEAN; C) Calidad local estimada por residuo; D) Calidad de los residuos; E) Resultados MolProbity; F) Estructura tridimensional del modelo generado; G) Diagrama de Ramachandran.**



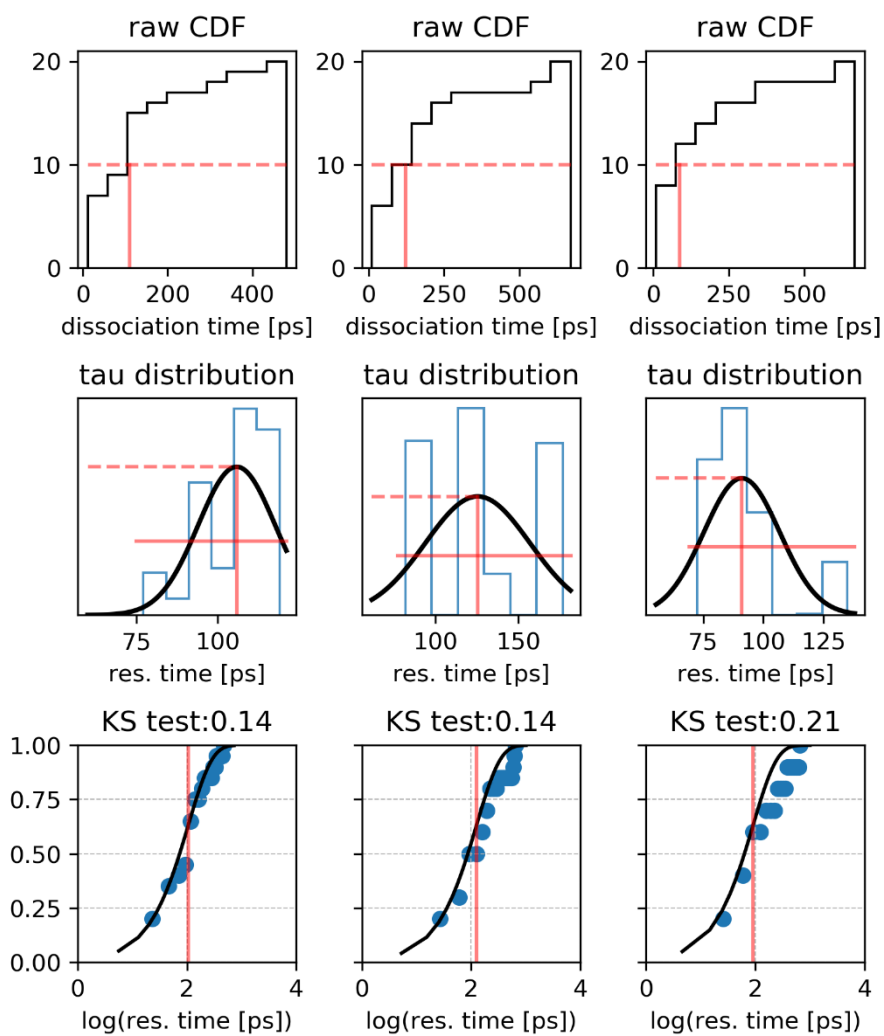
**Figura A2. Evaluación local y global del modelo  $\beta$ -tubulina de *B. cinerea* obtenido en SwissModel. A) Puntaje Q-MEAN; B) Distribución normalizada del puntaje Q-MEAN; C) Calidad local estimada por residuo; D) Calidad de los residuos; E) Resultados MolProbity; F) Estructura tridimensional del modelo generado; G) Diagrama de Ramachandran.**



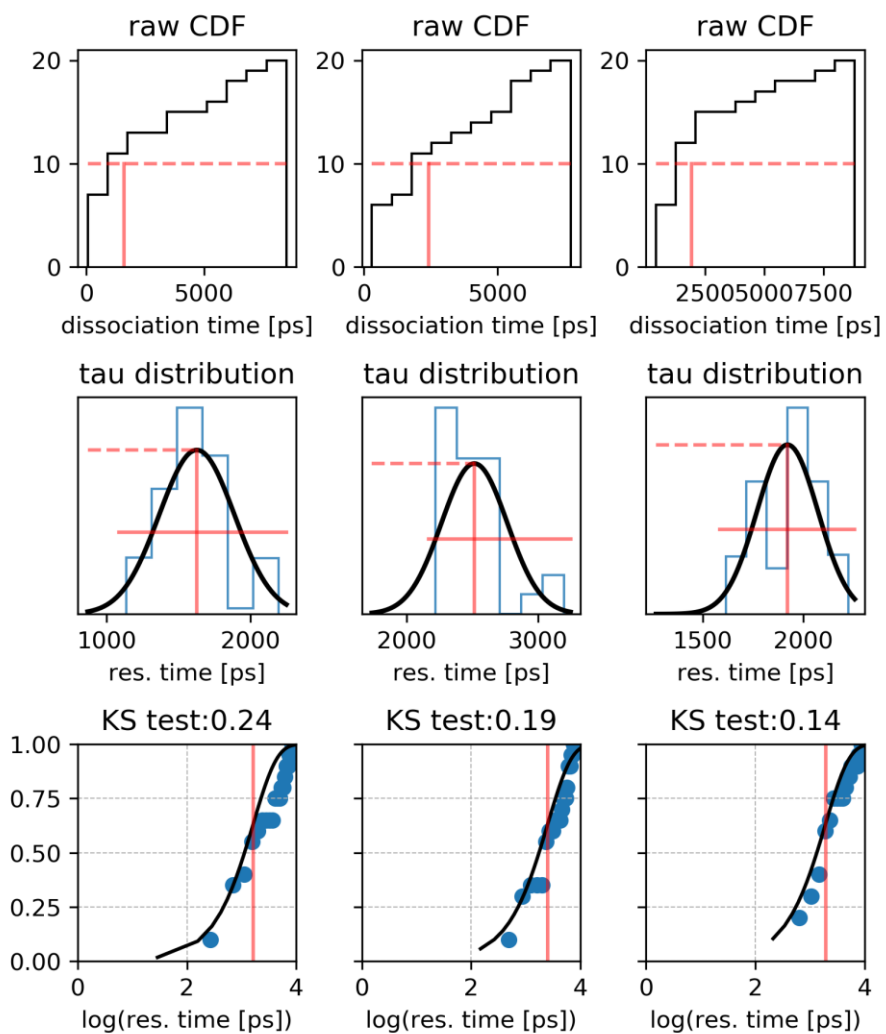
**Figura A3.** Modo de unión obtenido en el acoplamiento molecular de dietofencarb (**DEF**) en el modelo silvestre de la tubulina (**BcABT<sub>WT</sub>**)



**Figura A4.** Resultados del análisis estadístico de la metodología de  $\tau$ RAMD para CBZ en la proteína silvestre.



**Figura A4.** Resultados del análisis estadístico de la metodología de  $\tau$ RAMD para CBZ en la proteína mutante.



**Figura A4.** Resultados del análisis estadístico de la metodología de  $\tau$ RAMD para DEF en la proteína mutante.

## XI. REFERENCIAS

- (1) Adnan, M.; Hamada, M. S.; Hahn, M.; Li, G.-Q.; Luo, C.-X. Fungicide Resistance of Botrytis Cinerea from Strawberry to Procymidone and Zoxamide in Hubei, China. *Phytopathology Research* **2019**, 1 (1). <https://doi.org/10.1186/s42483-019-0024-8>.
- (2) Young, D. H. Anti-Tubulin Agents. In *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*; Springer Japan, 2015; pp 93–103. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_7).
- (1) Adnan, M.; Hamada, M. S.; Hahn, M.; Li, G.-Q.; Luo, C.-X. Fungicide Resistance of Botrytis Cinerea from Strawberry to Procymidone and Zoxamide in Hubei, China. *Phytopathology Research* **2019**, 1 (1). <https://doi.org/10.1186/s42483-019-0024-8>.
- (2) Young, D. H. Anti-Tubulin Agents. In *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*; Springer Japan, 2015; pp 93–103. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_7).
- (3) Malandrakis, A. A.; Markoglou, A. N.; Ziogas, B. N. PCR-RFLP Detection of the E198A Mutation Conferring Resistance to Benzimidazoles in Field Isolates of Monilinia Laxa from Greece. *Crop Protection* **2012**, 39, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.04.001>.
- (4) Romanazzi, G.; Feliziani, E. Botrytis Cinerea (Gray Mold). In *Postharvest Decay: Control Strategies*; Elsevier Inc., 2014; pp 131–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00004-1>.
- (5) Cheung, N.; Tian, L.; Liu, X.; Li, X. The Destructive Fungal Pathogen Botrytis Cinerea—Insights from Genes Studied with Mutant Analysis. *Pathogens*. MDPI AG November 1, 2020, pp 1–46. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110923>.
- (6) Hua, L.; Yong, C.; Zhanquan, Z.; Boqiang, L.; Guozheng, Q.; Shiping, T. Pathogenic Mechanisms and Control Strategies of Botrytis Cinerea Causing Post-Harvest Decay in Fruits and Vegetables. *Food Quality and Safety*. Oxford University Press September 1, 2018, pp 111–119. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>.
- (7) Leroux, P.; Fritz, R.; Debieu, D.; Albertini, C.; Lanen, C.; Bach, J.; Gredt, M.; Chapeland, F. Mechanisms of Resistance to Fungicides in Field Strains of Botrytis Cinerea. In *Pest Management Science*; 2002; Vol. 58, pp 876–888. <https://doi.org/10.1002/ps.566>.
- (8) Han, P.; Rios-Miguel, A. B.; Tang, X.; Yu, Y.; Zhou, L. J.; Hou, L.; Liu, M.; Sun, D.; Jetten, M. S. M.; Welte, C. U.; Men, Y.; Lückner, S. Benzimidazole Fungicide Biotransformation by Comammox Nitrospira Bacteria: Transformation Pathways and Associated Proteomic Responses. *J Hazard Mater* **2023**, 445. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130558>.
- (9) Čermák, V.; Dostál, V.; Jelínek, M.; Libusová, L.; Kovář, J.; Rösel, D.; Brábek, J. Microtubule-Targeting Agents and Their Impact on Cancer Treatment. *European Journal of Cell Biology*. Elsevier GmbH May 1, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151075>.
- (10) Steinmetz, M. O.; Prota, A. E. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd October 1, 2018, pp 776–792. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.05.001>.

- 
- (11) Goodson, H. V.; Jonasson, E. M. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2018**, *10* (6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022608>.
- (12) Barreca, M.; Stathis, A.; Barraja, P.; Bertoni, F. An Overview on Anti-Tubulin Agents for the Treatment of Lymphoma Patients. *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc. July 1, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107552>.
- (13) Mollinedo, F.; Gajate, C. *Microtubules, Microtubule-Interfering Agents and Apoptosis*; 2003; Vol. 8.
- (14) Aguayo-Ortiz, R.; Cano-González, L.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Dominguez, L. Structure-Based Approaches for the Design of Benzimidazole-2-Carbamate Derivatives as Tubulin Polymerization Inhibitors. *Chem Biol Drug Des* **2017**, *90* (1), 40–51. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12926>.
- (15) 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 Journal* **2016**, *283* (1), 102–111. <https://doi.org/10.1111/febs.13555>.
- (16) Malandrakis, A.; Markoglou, A.; Ziogas, B. Molecular Characterization of Benzimidazole-Resistant *B. Cinerea* Field Isolates with Reduced or Enhanced Sensitivity to Zoxamide and Diethofencarb. *Pestic Biochem Physiol* **2011**, *99* (1), 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.11.008>.
- (17) Zhang, C. Q.; Liu, Y. H.; Zhu, G. N. Detection and Characterization of Benzimidazole Resistance of *Botrytis Cinerea* in Greenhouse Vegetables. *Eur J Plant Pathol* **2010**, *126* (4), 509–515. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9557-5>.
- (18) Banno, S.; Fukumori, F.; Ichiishi, A.; Okada, K.; Uekusa, H.; Kimura, M.; Fujimura, M. Genotyping of Benzimidazole-Resistant and Dicarboximide-Resistant Mutations in *Botrytis Cinerea* Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays. *Phytopathology* **2008**, *98* (4), 397–404. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0397>.
- (19) Carter, H. E.; Cools, H. J.; West, J. S.; Shaw, M. W.; Fraaije, B. A. Detection and Molecular Characterisation of *Pyrenopeziza Brassicae* Isolates Resistant to Methyl Benzimidazole Carbamates. *Pest Manag Sci* **2013**, *69* (9), 1040–1048. <https://doi.org/10.1002/ps.3585>.
- (20) Banno, S.; Fukumori, F.; Ichiishi, A.; Okada, K.; Uekusa, H.; Kimura, M.; Fujimura, M. Genotyping of Benzimidazole-Resistant and Dicarboximide-Resistant Mutations in *Botrytis Cinerea* Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays. *Phytopathology* **2008**, *98* (4), 397–404. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0397>.
- (21) Cai, M.; Lin, D.; Chen, L.; Bi, Y.; Xiao, L.; Liu, X. L. M233I Mutation in the  $\beta\beta$ -Tubulin of *Botrytis Cinerea* Confers Resistance to Zoxamide. *Sci Rep* **2015**, *5*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep16881>.
- (22) Vela-Corcía, D.; Romero, D.; De Vicente, A.; Pérez-García, A. Analysis of  $\beta$ -Tubulin-Carbendazim Interaction Reveals That Binding Site for MBC Fungicides Does Not Include Residues Involved in Fungicide Resistance. *Sci Rep* **2018**, *8* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25336-5>.



- (23) Vela-Corcía, D.; Romero, D.; De Vicente, A.; Pérez-García, A. Analysis of  $\beta$ -Tubulin-Carbendazim Interaction Reveals That Binding Site for MBC Fungicides Does Not Include Residues Involved in Fungicide Resistance. *Sci Rep* **2018**, *8* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25336-5>.
- (24) UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res* **2023**, *51* (D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>.
- (25) Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; de Beer, T. A. P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R.; Schwede, T. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46* (W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- (26) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *The Protein Data Bank*; 2000; Vol. 28. <http://www.rcsb.org/pdb/status.html>.
- (27) 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. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- (28) Kim, S.; Thiessen, P. A.; Bolton, E. E.; Chen, J.; Fu, G.; Gindulyte, A.; Han, L.; He, J.; He, S.; Shoemaker, B. A.; Wang, J.; Yu, B.; Zhang, J.; Bryant, S. H. PubChem Substance and Compound Databases. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44* (D1), D1202–D1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>.
- (29) Halgren, T. A. MMFF VI. MMFF94s Option for Energy Minimization Studies. *J Comput Chem* **1999**, *20* (7), 720–729. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199905\)20:7<720::AID-JCC7>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199905)20:7<720::AID-JCC7>3.0.CO;2-X).
- (30) *A Steepest-Descent Method for Optimization of Mechanical Systems*; 1976; Vol. 19.
- (31) Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. *SOFTWARE Open Access Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform*; 2012; Vol. 4. <http://www.jcheminf.com/content/4/1/17>.
- (32) M. J. Frisch, G. W. T. H. B. S. G. E. S. M. A. R. J. R. C. G. S. V. B. G. A. P. et al. Gaussian 16. Wallingford CT 2016.
- (33) Cundary, T. R.; Gordon, M. S. *UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations*; 1992; Vol. 114. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- (34) Řezáč, J.; Fanfrlík, J.; Salahub, D.; Hobza, P. Semiempirical Quantum Chemical PM6 Method Augmented by Dispersion and H-Bonding Correction Terms Reliably Describes Various Types of Noncovalent Complexes. *J Chem Theory Comput* **2009**, *5* (7), 1749–1760. <https://doi.org/10.1021/ct9000922>.
- (35) Eberhardt, J.; Santos-Martins, D.; Tillack, A. F.; Forli, S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J Chem Inf Model* **2021**, *61* (8), 3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>.

- (36) Morris, G. M.; Ruth, H.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. Software News and Updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J Comput Chem* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- (37) Valdés-Tresanco, M. S.; Valdés-Tresanco, M. E.; Valiente, P. A.; Moreno, E. AMDock: A Versatile Graphical Tool for Assisting Molecular Docking with Autodock Vina and Autodock4. *Biol Direct* **2020**, *15* (1). <https://doi.org/10.1186/s13062-020-00267-2>.
- (38) 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. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- (39) Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. November 15, 2006, pp 712–725. <https://doi.org/10.1002/prot.21123>.
- (40) Silva, D.; Vranken, B. F. *ACPYPE-AnteChamber PYthon Parser Interface*; 2012; Vol. 5. <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/5/367>.
- (41) Hünenberger, P. H. Thermostat Algorithms for Molecular Dynamics Simulations. *Advances in Polymer Science*. 2005, pp 105–147. <https://doi.org/10.1007/b99427>.
- (42) Parrinello, M.; Rahman, A. Strain Fluctuations and Elastic Constants. *J Chem Phys* **1982**, *76* (5), 2662–2666. <https://doi.org/10.1063/1.443248>.
- (43) 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv315>.
- (44) Kokh, D. B.; Amaral, M.; Bomke, J.; Grädler, U.; Musil, D.; Buchstaller, H. P.; 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* (7), 3859–3869. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b00230>.
- (45) Gapsys, V.; De Groot, B. L. Pmx Webserver: A User Friendly Interface for Alchemy. *J Chem Inf Model* **2017**, *57* (2), 109–114. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00498>.
- (46) Gapsys, V.; Michielssens, S.; Seeliger, D.; De Groot, B. L. Pmx: Automated Protein Structure and Topology Generation for Alchemical Perturbations. *J Comput Chem* **2015**, *36* (5), 348–354. <https://doi.org/10.1002/jcc.23804>.
- (47) Bennett, C. H. *Efficient Estimation of Free Energy Differences from Monte Carlo Data*; 1976; Vol. 22.
- (48) Rodrigues, C. H. M.; Pires, D. E. V.; Ascher, D. B. DynaMut: Predicting the Impact of Mutations on Protein Conformation, Flexibility and Stability. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46* (W1), W350–W355. <https://doi.org/10.1093/nar/gky300>.

- (49) Frappier, V.; Chartier, M.; Najmanovich, R. J. ENCoM Server: Exploring Protein Conformational Space and the Effect of Mutations on Protein Function and Stability. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43* (W1), W395–W400. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv343>.
- (50) Pires, D. E. V.; Ascher, D. B.; Blundell, T. L. MCSM: Predicting the Effects of Mutations in Proteins Using Graph-Based Signatures. *Bioinformatics* **2014**, *30* (3), 335–342. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt691>.
- (51) Pandurangan, A. P.; Ochoa-Montaño, B.; Ascher, D. B.; Blundell, T. L. SDM: A Server for Predicting Effects of Mutations on Protein Stability. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45* (W1), W229–W235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx439>.
- (52) Pires, D. E. V.; Ascher, D. B.; Blundell, T. L. *DUET: A Server for Predicting Effects of Mutations on Protein Stability Using an Integrated Computational Approach*. <http://structure.bioc.cam.ac.uk/mcsm/data>.
- (53) Savojardo, C.; Fariselli, P.; Martelli, P. L.; Casadio, R. INPS-MD: A Web Server to Predict Stability of Protein Variants from Sequence and Structure. *Bioinformatics* **2016**, *32* (16), 2542–2544. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw192>.
- (54) Chen, Y.; Lu, H.; Zhang, N.; Zhu, Z.; Wang, S.; Li, M. PremPS: Predicting the Impact of Missense Mutations on Protein Stability. *PLoS Comput Biol* **2020**, *16* (12 December). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008543>.
- (55) Cheng, J.; Randall, A.; Baldi, P. Prediction of Protein Stability Changes for Single-Site Mutations Using Support Vector Machines. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **2006**, *62* (4), 1125–1132. <https://doi.org/10.1002/prot.20810>.
- (56) Rabal, O. Herramientas de Cribado Virtual Aplicadas a Inhibidores de Tirosina Quinasas. Contribución al Desarrollo Del Programa PRALINS Para El Diseño de Quimiotecas Combinatorias., Centro Escola Técnica Superior IQS, Barcelona, 1990.
- (57) Bell, E. W.; Zhang, Y. DockRMSD: An Open-Source Tool for Atom Mapping and RMSD Calculation of Symmetric Molecules through Graph Isomorphism. *J Cheminform* **2019**, *11* (1). <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7>.
- (58) Guzmán-Ocampo, D. C.; Aguayo-Ortiz, R.; Cano-González, L.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Dominguez, L. Effects of the Protonation State of Titratable Residues and the Presence of Water Molecules on Nocodazole Binding to  $\beta$ -Tubulin. *ChemMedChem* **2018**, *13* (1), 20–24. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700530>.
- (59) Hollingsworth, S. A.; Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*. Cell Press September 19, 2018, pp 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>.
- (60) Rabal, O.; En El Centro, G. *TESIS DOCTORAL*. [www.url.es](http://www.url.es).
- (61) Kufareva, I.; Abagyan, R. Methods of Protein Structure Comparison. *Methods in Molecular Biology* **2012**, *857*, 231–257. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_10).

- (62) Martínez, L. Automatic Identification of Mobile and Rigid Substructures in Molecular Dynamics Simulations and Fractional Structural Fluctuation Analysis. *PLoS One* **2015**, *10* (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119264>.
- (63) Tonge, P. J. Drug-Target Kinetics in Drug Discovery. *ACS Chemical Neuroscience*. American Chemical Society January 17, 2018, pp 29–39. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00185>.
- (64) Aldeghi, M.; Gapsys, V.; De Groot, B. L. Accurate Estimation of Ligand Binding Affinity Changes upon Protein Mutation. *ACS Cent Sci* **2018**, *4* (12), 1708–1718. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00717>.
- (65) Cai, M.; Lin, D.; Chen, L.; Bi, Y.; Xiao, L.; Liu, X. L. M233I Mutation in the  $\beta$ -Tubulin of *Botrytis Cinerea* Confers Resistance to Zoxamide. *Sci Rep* **2015**, *5*. <https://doi.org/10.1038/srep16881>.
- (66) Hashimoto, T. Dissecting the Cellular Functions of Plant Microtubules Using Mutant Tubulins. *Cytoskeleton*. April 2013, pp 191–200. <https://doi.org/10.1002/cm.21099>.
- (67) 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*. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109398>.
- (68) Shamsara, J. Evaluation of 11 Scoring Functions Performance on Matrix Metalloproteinases. *Int J Med Chem* **2014**, *2014*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/162150>.
- (69) Velec, H. F. G.; Gohlke, H.; Klebe, G. DrugScoreCSD-Knowledge-Based Scoring Function Derived from Small Molecule Crystal Data with Superior Recognition Rate of near-Native Ligand Poses and Better Affinity Prediction. *J Med Chem* **2005**, *48* (20), 6296–6303. <https://doi.org/10.1021/jm050436v>.