

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Interação entre (R, S) zoxamida e β -tubulina de *Phytophthora infestans*:
Avaliação do risco de resistência e da perda de função proteica por meio de
dinâmica molecular**

Gabriel Alves
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

GABRIEL ALVES

**Interação entre (R, S) zoxamida e β -tubulina de *Phytophthora infestans*:
Avaliação do risco de resistência e da perda de função proteica por meio de
dinâmica molecular**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Eduardo S. Gomide Mizubuti

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A474i
2025
Alves, Gabriel, 1997-
Interação entre (R, S) zoxamida e β -tubulina de
Phytophthora infestans: avaliação do risco de resistência e da
perda de função proteica por meio de dinâmica molecular /
Gabriel Alves. – Viçosa, MG, 2025.

1 tese eletrônica (83 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Fitopatologia, 2025.

Referências bibliográficas: f. 52-64.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.633>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Phytophthora infestans*. 2. Requeima - Controle.
3. Fungicidas. 4. Batata - Doenças e pragas. 5. Tomate -
Doenças e pragas. I. Mizubuti, Eduardo Seiti Gomide, 1966-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.
III. Título.

CDD 22. ed. 632.446

GABRIEL ALVES

**Interação entre (R, S) zoxamida e β -tubulina de *Phytophthora infestans*:
Avaliação do risco de resistência e da perda de função proteica por meio de
dinâmica molecular**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de setembro de 2025.

Assentimento:

Gabriel Alves
Autor

Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pelo autor em 02/10/2025 às 13:31:58 e pelo orientador em 02/10/2025 às 13:33:31. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **HR6U.GHGG.86R8** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Ao Bom Deus por me criar, remir, amar e conduzir em sua insondável misericórdia.

A Santíssima Virgem Maria, boa mãe e fiel intercessora.

A meus amados pais Carlos e Maria Aparecida e queridos irmãos Samuel, Paulo e Maria.

A minha amada esposa Júlia Mayrink Ferreira Alves e ao nosso querido filho Carlos Mayrink Alves.

Ao Professor Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, pela amizade, por todo o conhecimento transmitido, pela paciência, por cada conversa e pela orientação ao longo dos anos.

Aos membros do Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos da UFV, pela amizade e troca de experiências.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste doutorado.

Agradeço o uso do cluster Coaraci (Fapesp Proc. 2019/17874-0) e ao Center for Computing in Engineering and Sciences at Unicamp (Fapesp Proc. 2013/08293-7).

Agradeço o uso do cluster LaMCAD/UFG e o apoio da equipe técnica.

Agradeço o uso do cluster DGX/UFV e o apoio da equipe técnica.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia da UFV e a todos os Professores e técnicos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Totus tuus

RESUMO

ALVES, Gabriel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2025. **Interação entre (R, S) zoxamida e β -tubulina de *Phytophthora infestans*: Avaliação do risco de resistência e da perda de função proteica por meio de dinâmica molecular.** Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

A doença conhecida como requeima é um dos principais fatores bióticos que comprometem a produtividade da batateira e do tomateiro. A aplicação de oomicidas é a principal medida de controle desta doença causada por *Phytophthora infestans*. Dentre os ativos usados para o controle da requeima, a molécula química conhecida como zoxamida é destaque pela eficiência de controle e pela ausência de resistência conhecida em populações de *P. infestans*. Zoxamida tem seu sítio de ligação na β -tubulina, prejudica a estabilidade de microtúbulos e impede a divisão celular. Neste trabalho, a utilização de métodos computacionais de modelagem molecular no sistema oomicida-alvo molecular, foi empregada na avaliação do risco de resistência a zoxamida em *P. infestans*. Neste contexto, a diversidade do sítio de ligação de zoxamida foi acessada pelo método de saturação de substituição. Simulações de dinâmica molecular foram utilizadas para caracterizar o sítio e o modo de ligação da zoxamida, assim como o impacto de alterações pontuais de resíduos de aminoácido contra (R,S)-zoxamida. A região da β -tubulina, correspondente ao entorno do sítio de interação do oomicida, é pouco variável suportando menos de 18% do total do número de substituições teoricamente possíveis. A ligação dos isômeros de zoxamida no sítio de ligação é governada principalmente por seleção conformacional. ILE236, CYS239 e ANS247 são os principais resíduos de aminoácidos envolvidos na interação β -tubulina-zoxamida. Aparentemente, dentre as interações importantes para a estabilidade do inibidor no sítio há ligações de halogênio. A diminuição na frequência e a perda de interações entre isômeros e sítio de ligação é um dos principais fatores que justificam a resistência. A resistência de *P. infestans* a zoxamida não apresenta impedimento à ocorrência do ponto de vista protéico. O uso de métodos computacionais de modelagem molecular permitiu compreender os eventos de ordem atômica que governam a interação entre oomicida-proteína. Os resultados deste estudo e as ferramentas aqui empregadas podem ajudar no design racional de outros oomicidas e fungicidas, tanto no estágio de pré-lançamento como no posterior monitoramento da eficiência no campo e risco de resistência.

Palavras-chave: dinâmica molecular; requeima ; fungicida; oomicida; modelagem molecular

ABSTRACT

ALVES, Gabriel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2025. **Interaction between (R, S) zoxamide and β -tubulina from *Phytophthora infestans*: Evaluation of the resistance risk and loss of protein function by molecular dynamics.** Adviser: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Late blight is caused by the oomycete *Phytophthora infestans* and is one of the main biotic factors that compromise yields of potato and tomato crops. Management of late blight is almost exclusively dependent on the application of oomycides. Zoxamide is a site-specific active ingredient that affects β -tubulina disrupting cell division. To date, there is no report of resistance in populations of *P. infestans* to zoxamide. The use of molecular modeling applied to the study of proteins can help in the evaluation of the resistance risk to zoxamide as to its different isomers. In this work, the diversity of the zoxamide binding site was assessed by the saturation substitution method. Molecular dynamics simulations were used to characterize the site and zoxamide binding mode, and the impact of specific amino acid residue changes against (R,S)-zoxamide was evaluated. The region around the site of interaction with the oomycide in *P. infestans* is slightly variable, supporting less than 18% of the total number of possible substitutions. The binding of zoxamide isomers at the site is governed primarily by conformational selection. Residues ILE236, CYS239 and ASN247 are the most important for ligand-protein interaction. A halogen bond appears to occur between protein-zoxamide and is reported here for the first time. The decrease in frequency and loss of interactions between isomers and binding site(s) is one of the main factors that explains resistance. There is no apparent hindrance to the occurrence of resistance in *P. infestans* to zoxamide. The use of computational molecular modeling methods allowed us to understand the atomic events that govern the oomycide-protein interaction. The results of this study and the tools employed here can aid in the rational design of oomycides and fungicides, both at the pre-release stage and in subsequent monitoring of field effectiveness and resistance risk.

Keywords: molecular dynamics ; late blight ; fungicide ; oomycide; molecular modeling

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	10
REVISÃO DE LITERATURA.....	11
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICE.....	66

1. Introdução

A relação entre substituição de resíduos e a perda de eficiência dos inibidores é conhecida para diferentes grupos em diferentes espécies de fungos e oomicetos causadores de doenças em plantas (YIN et al, 2023; SIEROTZKI & SCALLIET, 2013), mas aparentemente superficialmente estudada e não compreendida em sua totalidade. A avaliação do impacto de substituições pontuais de resíduos de aminoácido no sítio de interação de um fungicida ou oomicida é frequentemente estudada em ensaios de fenotipagem da sensibilidade, e é o principal método de monitoramento da resistência.

O acesso à diversidade teórica do sítio de ligação do inibidor e a caracterização do impacto das substituições pontuais na interação, no nível atômico, tem grande utilidade no estudo da resistência a antimicrobianos. O uso de ferramentas de modelagem molecular pode fornecer informações básicas e aplicadas relacionadas ao monitoramento de resistência bem como para o desenho racional de novas moléculas, com maior robustez frente à evolução adaptativa dos patógenos (McDONALD & LINDE, 2002).

Estudos em farmacologia médica demonstram o valor dessa abordagem para compreender mecanismos de resistência a antimicrobianos clínicos e no reposicionamento de moléculas. Por exemplo, simulações de dinâmica molecular foram aplicadas para investigar a resistência em *Streptococcus suis* a cefuroxime e PBP2x (GE et al, 2012). O mecanismo de ligação de triazóis em CYP51, a identificação e o reposicionamento de fármacos contra o mesmo alvo em *Candida albicans* foram possíveis devido ao uso de dinâmica molecular (SHI et al, 2020; ZALA et al, 2023; VERMA et al, 2021). Esses estudos não apenas confirmam a importância de modelagens moleculares no entendimento da resistência clínica, mas também reforçam o potencial dessas metodologias para prever e mitigar falhas terapêuticas.

Phytophthora infestans, agente causal da requeima da batata e do tomate, constitui um modelo particularmente relevante para esse tipo de análise, devido à sua importância econômica e ao histórico de rápida adaptação a oomicidas (Fry et al, 2015). A zoxamida, um benzamida oomicida que atua na inibição da

polimerização de microtúbulos via ligação à β -tubulina (YOUNG et al, 2001), representa um caso de interesse especial. Embora não haja relatos extensivos de resistência de campo, a pressão seletiva exercida pelo uso contínuo do composto torna fundamental compreender se substituições em resíduos críticos do sítio de ligação poderiam comprometer sua eficácia e, simultaneamente, prejudicar a função estrutural da proteína.

O objetivo geral desta tese foi estudar o sistema *Phytophthora infestans*-zoxamida. Especificamente, buscou-se: caracterizar a diversidade conformacional do inibidor e elucidar o modo de ligação quanto aos resíduos de aminoácido mais importantes; acessar a diversidade potencial do sítio de ligação com o uso da abordagem de saturação de substituição; e entender o possível impacto de um grupo de substituições no fenótipo de sensibilidade ao oomicida. A adoção dessa estratégia baseada em dinâmica molecular tem o potencial de gerar informações fundamentais sobre o risco de evolução da resistência em *P. infestans* e em outros oomicetos, além de contribuir para o avanço no desenho racional de novos compostos antimicrobianos aplicáveis à agricultura.

2. Revisão de Literatura

2.1. O fitopatógeno e o controle da requeima.

Phytophthora infestans (Mont.) De Bary é o agente etiológico da doença conhecida como requeima da batateira (*Solanum tuberosum* L.) e do tomateiro (*Solanum lycopersium* L.), principais hortaliças cultivadas no Brasil. A doença foi responsável por causar uma das epidemias de doenças de plantas de maior gravidade sócio-político-econômica da história da humanidade, a chamada Grande Fome da Irlanda (HAVERKORT et al, 2008; WEBSTER & WEBER, 2007; WOODHAM-SMITH, 1962). No presente, epidemias de requeima continuam sendo destrutivas em culturas de ambas as solanáceas (FRY, 2016; WEBSTER & WEBER, 2007).

Os danos causados pelo patógeno e a dificuldade enfrentada em seu manejo se deve, em parte, ao curto período latente da doença, 5 a 7 dias, o que, conseqüentemente, implica em epidemias com altas taxas de progresso (FIORINI et

al, 2010). Após o estabelecimento da doença na área, a requeima pode comprometer grandes proporções do tecido vegetal em curto período de tempo. No caso de infecção severa nos estágios iniciais da cultura, toda a produção poderá ser comprometida e o cultivo dizimado.

Quando consideramos as populações de *P. infestans* é relevante entender a dinâmica dos genótipos que compõem a espécie. Tal separação prevê o agrupamento dos indivíduos quanto ao padrão de sequência de DNA observado pela amplificação de regiões específicas por microssatélite ou repetições de sequências simples (SSR), polimorfismo do comprimento de fragmento de restrição (RFLP), aloenzimas, e haplótipos mitocondriais (FRY, 2016). A separação de uma população em genótipos permite agrupar os indivíduos quanto a características importantes para o manejo da doença como suplantação de resistência de uma cultivar, severidade diferencial, especificidade à cultura hospedeira e o perfil de sensibilidade a oomicidas (FRY and GOODWIN, 1997; GRÜNWARD & FLIER, 2005; FRY, 2016; ABULEY & HANSEN, 2022; ABULEY et al, 2023). A descendência de genótipo gerada por reprodução assexuada constitui uma linhagem clonal em populações de *P. infestans*. Linhagens clonais podem apresentar variantes geradas por mutação ou recombinação mitótica (FRY & GOODWIN, 1997). Linhagens clonais são o componente principal das populações de *P. infestans* em regiões onde a reprodução sexual é um evento raro ou inexistente.

A introdução de variantes ou a movimentação de indivíduos de uma linhagem clonal do patógeno pode ser acompanhada de impactos econômicos e sociais negativos (FRY, 2016). No caso das culturas da batata e do tomate, a dispersão do patógeno a longa distância por tubérculos de batata-semente ou mudas e frutos de tomate infectados podem viabilizar o fluxo gênico a nível nacional e internacional (FRY, 2016; FRY, 2016; FRY and GOODWIN, 1997). Além disso, a dispersão de esporângios pelo ar também é importante para o fluxo de genótipos de *P. infestans* (McDONALD & LINDE, 2002).

O tamanho efetivo da população, associada ao modo de dispersão e a possibilidade de reprodução assexuada e sexuada em populações de *P. infestans* classifica este patógeno como de elevado potencial evolutivo. Esta classificação está associada à elevada probabilidade de suplantarem a resistência de planta hospedeira e ao desenvolvimento de resistência a fungicidas com ação oomicida, ou seja compostos químicos com ação específica contra oomicetos (GOVERS, 2001)

(McDONALD & LINDE, 2002). O elevado potencial evolutivo do patógeno explica, em parte, a dificuldade no manejo da requeima da batateira e do tomateiro.

Considerando o manejo da requeima, atualmente não há variedades resistentes que reúnam as características de interesse agrônômico encontradas nos materiais suscetíveis. O clima favorável à doença e a diversidade da população do patógeno são determinantes na instabilidade da resistência observada em variedades de batata (ABULEY & HANSEN., 2022). A alta plasticidade da região rica em repetições no DNA cromossômico, onde estão presentes os genes efetores de *P. infestans* e o número destes genes parecem estar associados à especificidade do patógeno e à capacidade de rapidamente suplantar a resistência em plantas (HAAS et al, 2009). Com isso, globalmente, a aplicação de compostos químicos de ação fungicida e oomicida é a estratégia de manejo mais eficaz para o manejo da requeima (FRY, 2016).

O controle da doença com o uso de oomicidas é desafiador, requerendo posicionamento temporal adequado da aplicação. Pelo fato de as epidemias apresentarem altas taxas de progresso, o controle químico não admite erros. Nas regiões de clima favorável, várias aplicações de oomicidas podem ser realizadas com o propósito de reduzir a intensidade da requeima. É importante ressaltar que a maioria dos oomicidas é sítio-específico e, não raro, indivíduos resistentes podem ocorrer na população do patógeno. Consequentemente, o uso inadequado de oomicidas pode resultar na seleção de indivíduos resistentes que eventualmente constituirão populações de *P. infestans* insensíveis aos tratamentos aplicados.

2.2. Resistência a oomicidas.

Resistência de *P. infestans* a metalaxyl, mefenoxam, propamocarbe e, recentemente, à mandipropamida e oxatiapiprolin já foram relatadas (GRÜNWARD & FLIER, 2005; MÖLLER et al, 2009; ABULEY et al, 2023). Resistência de *P. infestans* a ativos como zoxamida, azoxistrobina, cimoxanil, fluopicolide, cyazofamid, dimetomorfe, fluazinam e mancozebe, que normalmente são empregados no manejo da requeima, não é conhecida (SAVILLE et al, 2015; GRÜNWARD et al, 2006). No México, mesmo antes do início do uso de metalaxyl, já ocorriam isolados de *P. infestans* resistentes a este ingrediente ativo (GRÜNWARD & FLIER, 2005). Na Dinamarca, o genótipo EU43 é insensível à mandipropamida e sua frequência era de

menos de oito por cento nos levantamentos conduzidos até aproximadamente meados dos anos 2010. No entanto, o cenário mudou e EU43 se tornou o genótipo mais frequente em um intervalo de apenas cinco anos (ABULEY et al, 2023). Tal alteração de padrão justifica o monitoramento da resistência nas populações antes do lançamento dos oomicidas, ou seja, realizar um estudo de sensibilidade basal (*baseline*), e posteriormente seguir com avaliações periódicas em grande escala nas lavouras de batata e tomate.

Dentre as abordagens que podem ser utilizadas para o monitoramento da resistência, o estudo de eventos de substituições pontuais de resíduos de aminoácidos no alvo proteico do fungicida e, ou, oomicida, que conduzem à diminuição de sensibilidade ou à resistência ao agente, merecem destaque na fitopatologia. A relação de substituições de resíduos com a perda de eficiência de moléculas de diferentes grupos (benzimidazóis, inibidores da miosina, inibidores da demetilação de esterol, inibidores da quinona externa, inibidores da succinato desidrogenase, anilino pirimidinas, amida ácidos carboxílicos, e inibidores da OSBPI) em diferentes espécies de fitopatógenos é conhecida (YIN et al, 2023), mas aparentemente pouco explorada. Neste cenário a utilização de abordagens que permitam acessar tais informações poderão fornecer resultados valiosos para o monitoramento da eficiência de fungicidas, e oomicidas, após a introdução no mercado, e no *design* de novas moléculas.

2.3. Genoma de *Phytophthora infestans*: Organização, transmissão, diversidade e impacto na resistência a oomicidas.

O genoma total de *P. infestans* é intrigante em suas características. O tamanho estimado é de 240 Mb, sendo consideravelmente maior que o genoma de *P. sojae* (95 Mb) e *P. ramorum* (65 Mb) (HAAS et al., 2009), por exemplo. Além disso apresenta alta percentagem de repetições, 74%, cerca de 51% de conteúdo G+C e 17.797 genes preditos por método computacional, e grandes regiões intergênicas estão presentes (HAAS et al, 2009). A distribuição da densidade gênica é tida como descontínua e não usual. Maior densidade de genes que são conservados no gênero *Phytophthora*, em *P. infestans*, se encontra em regiões flanqueadas por repetições (HAAS et al, 2009).

O sequenciamento dos genomas de dois indivíduos de *P. infestans* na Coreia do Sul produziu resultado divergente de trabalho anterior (HAAS et al, 2009). Os isolados coreanos foram sequenciados utilizando o método de *long read* e *short read* e constatou-se, quanto ao tamanho do genoma, para um dos indivíduos, tamanho inferior e para o outro superior ao anteriormente sequenciado; menor número de repetições e maior número de genes (LEE et al, 2020). Tal resultado, discrepante com o trabalho de Haas e colaboradores, pode estar condicionado ao método de montagem do genoma, predição de genes ou a diversidade natural do patógeno. No entanto, uma resposta assertiva sobre a justificativa desta diferença no DNA dos diferentes indivíduos sequenciados ainda não foi relatada na literatura.

Phytophthora infestans é um organismo heterotálico, portanto, a reprodução sexuada ocorre quando indivíduos de grupo de acasalamento distinto (A1 e A2) trocam material genético. Alguns indivíduos, no entanto, são autoférteis e podem formar oósporos por “auto-fecundação” ou quando pareados com indivíduos de qualquer grupo de acasalamento (CASA-COILA et al, 2017). A reprodução sexuada permite a recombinação, o que pode melhorar a adaptabilidade da prole em relação aos parentais (COOK & LEES, 2004). Como resultante da reprodução sexuada tem-se a produção de oósporos, esporos de resistência que podem permanecer no campo em situações adversas, na ausência do hospedeiro, e servir como inóculo inicial (COOK & LEES, 2004). Na ausência de reprodução sexual a população será composta de linhagens clonais dos genótipos presentes, diversificadas por mutação ou recombinação mitótica (FRY & GOODWIN, 1997). Em um estudo envolvendo isolados de *P. infestans*, dos grupos A1 e A2 oriundos do México, verificou-se a ocorrência de recombinação nos acasalamentos e um padrão cromossômico consistente com indivíduos diplóides. Além disso, alta taxa de germinação de oósporos, e indivíduos auto-férteis oriundos dos cruzamentos foram recuperados (SHATTOCK et al, 1986). Posteriormente, em 1987, Tooley e Therrien, utilizando o método de coloração de Feulgen avaliaram a ploidia de isolados oriundos do México, Estados Unidos, Holanda, Irlanda, País de Gales e Itália. Os autores observaram que a população mexicana majoritariamente diplóide, e a não mexicana variando em indivíduos diplóides, triplóides, tetraplóides e aneuplóides; com a suspeita dos indivíduos tetraplóides, na prática, funcionarem como diplóides (TOOLEY & THERRIEN, 1987). Aparentemente, indivíduos diploides e tetraploides

são os mais frequentes em *P. infestans* (CATEN & DAY, 1977; WHITTAKER et al., 1991).

Mutação é o principal mecanismo evolutivo gerador de variabilidade genética nas populações. Identificar a diferença na taxa de mutação entre DNA cromossômico e DNA mitocondrial (mtDNA) pode fornecer uma explicação para a diversidade observada nas populações. Estudar a taxa de mutação permite também compreender a diversidade bem como inferir a probabilidade de ocorrência e da transmissibilidade de características desejadas ou de fenótipos indesejados, como por exemplo os que levam a resistência a moléculas fungicidas e oomicidas.

Em um estudo de variabilidade do mtDNA e do DNA de *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. megakarya*, *P. palmivora*, *P. citricola* e *P. parasitica*, foi verificado, com o uso de enzimas de restrição e o método de hibridação, maior conservação e menor taxa de mutação do mtDNA em relação ao DNA cromossômico (FÖRSTER et al, 1990). Devido às espécies estudadas compartilharem o mesmo gênero de *P. infestans*, é razoável hipotetizar que tal fato ocorra em *P. infestans*. Neste caso, espera-se menor variabilidade da sensibilidade a fungicidas e oomicidas que interferem na respiração celular, especificamente nos complexos II e III da cadeia de transporte de elétrons. Recentemente, realizou-se um estudo de saturação de mutagênese nos gene *Cytb* de *P. infestans* e constatou-se aparente inexistência de impedimento estrutural à ocorrência de isoformas do citocromo b insensíveis a azoxistrobina, o que pode explicar, em parte, que a não ocorrência de indivíduos resistentes a este oomicida está relacionada a menor taxa de mutação do mtDNA (Alves & Mizubuti, dados não publicados).

Por outro lado, muitos eventos de resistência a oomicidas são conhecidos para alvos moleculares que são sintetizados pelo DNA cromossômico. Assim, a classificação de *P. infestans* como patógeno de alto potencial evolutivo (McDONALD & LINDE, 2002) para resistência a oomicidas é principalmente devido a variações no DNA nuclear. Mutações no DNA podem resultar em resistência a múltiplas drogas (ZIOGAS et al., 2006). O uso de luz UV e de agentes mutagênicos como o etil metanossulfonato (EMS) resultou em indivíduos com resistência durável a mfenoxam e transiente a mandipropamida, dimetomorfe e iprovalicarbe (RUBIN et al., 2008). A resistência a oomicidas aparentemente, pode ter caráter dominante ou recessiva, a depender do alvo molecular, o que justificaria o estado transiente

observado nas moléculas do grupo das amidas do ácido carboxílico (RUBIN et al., 2008).

A resistência a fungicidas e oomicidas pode vir acompanhada de penalidade na adaptabilidade dos indivíduos na ausência da pressão de seleção gerada pelos ativos. Neste cenário, é fundamental estudar a probabilidade e o impacto de mutações no DNA que levem à perda de eficiência de oomicidas e as alterações funcionais causadas ao alvo molecular.

2.4. Zoxamida e microtúbulos: Mecanismo de ação e resistência ao fungicida e oomicida.

Zoxamida é uma molécula com ação fungicida/oomicida pertencente ao grupo dos inibidores da polimerização da tubulina (Grupo 22 do FRAC) que tem sido utilizada para o manejo da requeima. Essencialmente, a zoxamida interfere na formação de microtúbulos. O produto comercial é uma mistura racêmica entre dois isômeros, que ocorrem devido a um carbono quiral, composto pelos enantiômeros R-zoxamida (R-ZOX) e S-zoxamida (S-ZOX) (Fig.1) (PAN et al., 2020).

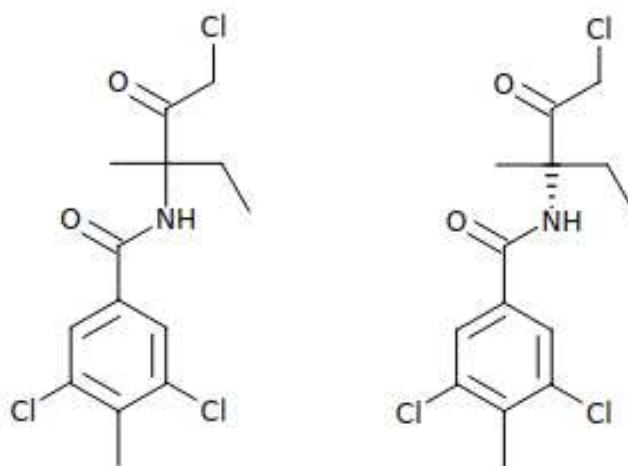


Figura 1. Isômeros de zoxamida. R-zoxamida a esquerda e S-zoxamida a direita.

Considerando a contribuição dos isômeros, R-ZOX possui maior bioatividade contra fitopatógenos e maior toxicidade contra organismos não alvo quando comparada à mistura racêmica e ao isômero S-ZOX (PAN et al., 2020). No entanto, o mecanismo associado a esta resposta ainda não está elucidado. Microtúbulos

são formados por um conjunto de filamentos proteicos (Fig 2) originados da união de heterodímeros compostos de α e β -tubulina, duas proteínas evolutivamente conservadas em eucariotos, com baixa diversidade intra e interespecífica (GADADHAR et al., 2017). Apesar da conservação das proteínas existem isoformas importantes para a diversidade funcional de microtúbulos. Além disso, a ocorrência de modificações pós-traducionais também interferem na diversidade funcional e na integridade estrutural e dinamicidade dos microtúbulos (HAMMOND et al., 2008; GADADHAR et al., 2017).

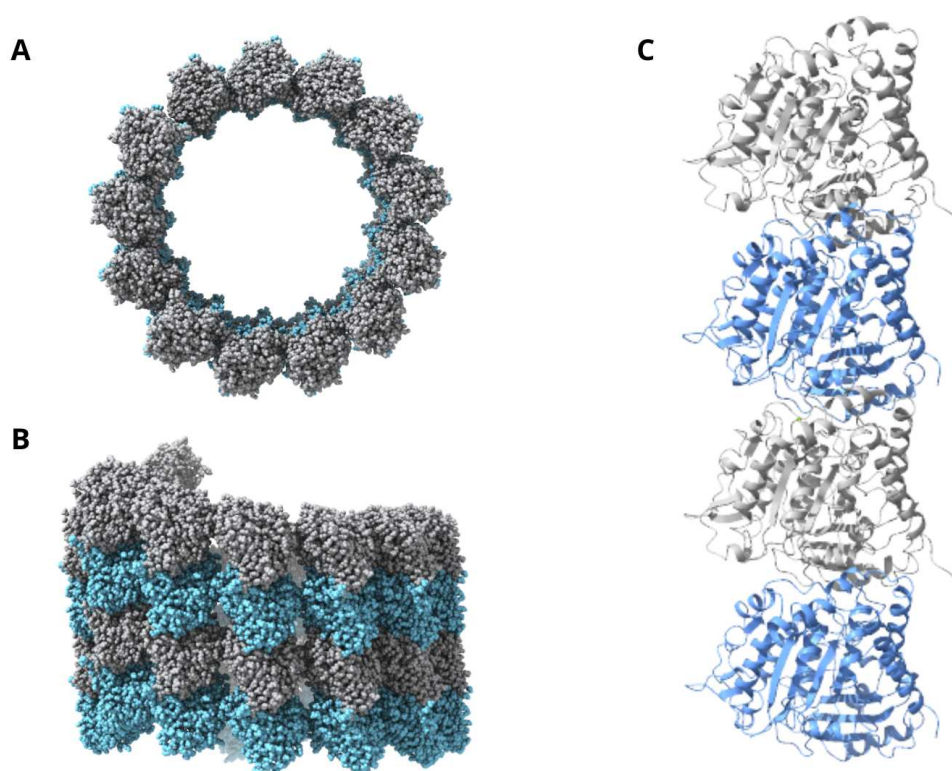


Figura 2. Estrutura do microtúbulo de *Bos taurus* (PDB-8C5C). Ápice do microtúbulo, representado em esferas (A). Filamentos de tubulinas associados lateralmente em um microtúbulo, representado em esferas (B). Destaque do fragmento de um filamento de α - β -tubulina, representado em cartoon (C). α -tubulina representada em azul centáurea e β -tubulina em cinza escuro.

O heterodímero de α - e β -tubulina é composto por duas proteínas com α -hélice, folha- β e *loops* como estrutura secundária (Fig. 2). Em ambas as proteínas há um sítio de ligação a nucleotídeo. Em α -tubulina este é denominado de sítio N

(*N-site*) e está ocupado por guanosina trifosfato (GTP) e em β -tubulina é chamado de sítio E (*E-site*) ocupado por GTP ou guanosina difosfato (GDP). O nome do sítio deriva da possibilidade ou não de troca do nucleotídeo ocupante (*N= non exchange*, *E=exchange*). Em cada sítio há um átomo de magnésio (Mg) importante para a permanência do nucleotídeo no sítio (DOWNING & NOGALES, 1998).

Os filamentos que compõem microtúbulos são formados pela junção longitudinal dos heterodímeros. A polimerização, estabilidade e despolimerização dos filamentos e do próprio microtúbulo, fundamental para a função biológica, é governada pela hidrólise de GTP a GDP no sítio E. O sítio E, diferente do N, está acessível ao solvente e permanece acessível na β -tubulina da extremidade apical. Os filamentos estáveis contêm GDP nas β -tubulinas do interior e GTP na β -tubulina apical. A hidrólise de GTP no sítio E da β -tubulina é fundamental para a junção dos heterodímeros na polimerização do filamento. No entanto, a hidrólise de GTP na β -tubulina do ápice do filamento desestabiliza-o devido a alteração na conformação da interface entre dímeros de filamentos adjacentes e da alteração na curvatura do heterodímero, isto desencadeia a despolimerização do filamento e por consequência do microtúbulo (DOWNING & NOGALES, 1998; FEDOROV et al., 2019).

Considerando o modo de ação, o efeito principal da zoxamida é o impedimento da divisão celular. Há interferência na regulação da dinâmica da polimerização e despolimerização dos microtúbulos (YOUNG & SLAWECKI, 2001). Além disso, considerando as demais funções de microtúbulos em fungos e oomicetos como: transporte de organelas como vesículas secretórias ou núcleo; posicionamento de mitocôndrias, núcleo e vacúolos; e manutenção do efeito de polarização na extremidade da hifa (WEBSTER & WEBER, 2007), pode-se hipotetizar potencial efeito da zoxamida sobre a nutrição, metabolismo e desenvolvimento de fungos e oomicetos. Em *P. cactorum*, o tratamento com zoxamida causou alterações morfológicas em hifas e nos níveis transcricionais de crio-proteínas e enzimas (MEI et al., 2014). Adicionalmente, em fungos, a ausência de *Spitzenkorper*, a severa redução do crescimento apical, a diminuição na secreção de enzimas e a redução na redistribuição de vesículas secretórias e de outras organelas através da hifa (WEBSTER & WEBER, 2007) parecem constituir evidências que suportam esta hipótese.

Estudos estruturais da transição conformacional, sítio de ligação e dos resíduos de aminoácido envolvidos na interação zoxamida- α - β -tubulina são

fundamentais para entender o modo de ação do ativo e os impactos de substituição de resíduos de aminoácido, causados por mutação, no fenótipo de sensibilidade em *P. infestans*. No entanto, não há dados experimentais estruturais da zoxamida ligada à β -tubulina, como os oriundos de cristalografia de raio-X, microscopia crioeletrônica ou ressonância magnética nuclear.

Apesar da ausência de dados estruturais, métodos experimentais como a fenotipagem de sensibilidade a zoxamida em laboratório, complementada por análise molecular do gene da β -tubulina, fornecem o conhecimento de substituições de resíduos de aminoácido que causam resistência ao ativo. Atualmente GLU198LYS, MET233ILE e PHE200TYR em *Botrytis cinerea*, CYS239SER/THR/GLY em *Plasmopara viticola*, CYS239SER em *P. sojae*, e a ocorrência natural de SER239 em *Pythium aphanidermatum* (CAI et al, 2015; CAI et al, 2016, ADNAN et al, 2018, PARACCHI et al, 2025) são conhecidas por causar resistência a zoxamida. Estes estudos, em conjunto com experimentos de modelagem molecular, permitiram supor um sítio de ligação, incluindo a ligação covalente da zoxamida na β -tubulina (YOUNG & SLAWECKI, 2001, DU et al., 2009; VELASCO-SAAVEDRA et al., 2023). A cisteína na posição 239 (Cys239) da β -tubulina, onde ocorre Cys239Ser, principal substituição responsável pela diminuição na sensibilidade à zoxamida, foi proposta como o resíduo onde a ligação covalente ocorre (Fig.3) (VELASCO-SAAVEDRA et al., 2023; CAI et al., 2016).

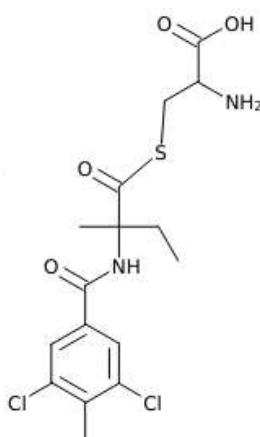


Figura 3. Representação da zoxamida ligada covalentemente a cisteína.

Algumas incertezas referentes à interação zoxamida- β -tubulina impedem os avanços na compreensão das substituições de resíduo de aminoácido, causadas por mutações no gene da β -tubulina. Substituições de resíduos de aminoácido no sítio de interação podem ser acompanhadas de resistência ao oomicida, como as anteriormente listadas, com penalidade ou não na adaptabilidade do fitopatógeno. Mutações que levam à resistência, mas que possuem uma penalidade associada, podem diminuir a importância da substituição do resíduo ou servir de alvo para o desenho de um novo inibidor (LAMBERTH, 2022). Estudar o sistema zoxamida- α - β -tubulina por meio de experimentos de modelagem molecular pode suprir a lacuna de conhecimento do modo de ação da zoxamida e do risco, do ponto de vista protéico, do desenvolvimento de resistência a zoxamida em *P. infestans*.

2.5. Modelagem molecular aplicada ao estudo de proteínas.

O conhecimento da sequência, estrutura tridimensional e a biofísica de uma proteína, é de grande valia e aplicabilidade prática. O “Protein Data Bank” (PDB) figura como um importante banco de dados de estruturas tridimensionais de proteínas (BERMAN et al, 2020). Porém, apesar da relevância do PDB, o número de estruturas depositadas e de organismos representados é restrito. Assim, isoformas proteicas ou a mesma proteína de um outro organismo em estudo podem não ser contempladas no banco de dados. Em vista destas restrições, a utilização de método computacional para a predição da estrutura 3D de proteínas pode ser de grande valia.

Diferentes abordagens computacionais podem ser utilizadas para a predição da estrutura tridimensional de uma proteína. A partir da disponibilidade e qualidade de informações associadas à proteína é possível escolher por modelagem molde-dependente ou uma técnica “livre de molde” (Kuhlman and Bradley, 2019). O percentual de similaridade entre a sequência da proteína que se deseja predizer a estrutura 3D e aquelas resolvidas experimentalmente, depositadas no PDB por exemplo, pode ser utilizado como um determinante do método mais adequado para realizar a predição da estrutura da proteína em estudo (Verli, 2014). Se a similaridade entre a proteína em estudo e a proteína molde for superior a 30%, o método de modelagem comparativa pode ser utilizado. Para valores de similaridade entre 20 e 29%, o método de modelagem “threading” pode ser empregado. Para

valores inferiores a 20%, normalmente são empregados métodos *de novo* ou *ab initio* (Verli, 2014). Considerando o método *ab initio*, recentemente desenvolveu-se um software baseado em rede neural chamado *AlphaFold*, este ganhou destaque pois os resultados obtidos são considerados como equiparáveis à resolução da estrutura obtida por método experimental não computacional (SENIOR et al, 2020).

Além da predição de estrutura proteica, a modelagem molecular pode ser utilizada como subsídio no estudo de evolução proteica (MITCHELL, 2017; LASKOWSKI et al, 2009), a predição de substituições de resíduos de aminoácido que podem ser suportadas por uma proteína sem que haja um comprometimento estrutural do ponto de vista energético é um exemplo (LEI et al, 2023; SCHYMKOWITZ et al, 2005). A predição da substituição de resíduos de aminoácido por métodos computacionais é feita por análises baseadas em campos de força ou por rede neural (BLAABEJERG et al, 2023; THIEKER et al, 2022; ÖHLKNECHT et al, 2021; BEMEJEE and MITRA 2020; DELGADO et al, 2019; FREY et al, 2010). Atualmente, os softwares mais comumente utilizados para este propósito são o FoldX (DELGADO et al, 2019; RADUSKY et al, 2022; LEI et al, 2023; TIBERTI et al, 2022) e Rosetta (THIEKER et al, 2022; VALANCIUTE et al, 2022).

O FoldX é útil para avaliar a propensão de um dado resíduo de aminoácido ocupar determinadas posições na estrutura tridimensional de proteínas. O programa é acurado, possui baixo custo computacional e permite utilizar modelos estruturais protéicos obtidos por métodos computacionais como arquivo de entrada para as simulações (VALANCIUTE et al, 2022). O FoldX fornece estimativas da variação da energia livre ($\Delta\Delta G$) entre a proteína com o resíduo de aminoácido "selvagem" ("tipo selvagem") e a proteína com o resíduo substituído ("mutante"), para assim estimar a propensão de diferentes resíduos ocuparem determinadas posições na estrutura tridimensional. Neste software, o cálculo de $\Delta\Delta G$ leva em consideração: as interações de van der Waals; a contribuição do solvente com grupos hidrofóbicos; solvente com grupos polares; as moléculas de água que fazem mais de duas ligações de hidrogênio com água; as contribuições de ligação de hidrogênio; de interação eletrostática entre átomos de diferentes cadeias polipeptídicas; a penalidade entrópica da conformação; o custo entrópico associado à fixação da cadeia lateral; e, por fim, a sobreposição estérica entre átomos na estrutura proteica (SCHYMKOWITZ et al, 2005). Com base na $\Delta\Delta G$ calculada é possível prever mutações estabilizadoras e desestabilizadoras da proteína, do ponto de vista

termodinâmico. No que diz respeito às substituições estabilizadoras, o FoldX permite inferir sobre a diversidade teórica que uma dada proteína pode assumir, favorecendo o estudo de evolução proteica.

A predição de estrutura proteica e o estudo de evolução de proteínas por modelagem molecular é útil para as análises de inibidores na interação oomicida-oomiceto permitindo uma melhor compreensão do risco de desenvolvimento de resistência (Alves & Mizubuti, dados não publicados). No entanto, a complementação com o uso de dinâmica molecular pode permitir a melhor descrição da diversidade teórica do sítio de ligação do inibidor devido ao aumento no número das estruturas utilizadas no FoldX (TIBERTI et al, 2022). Além disso, a descrição dos resíduos de aminoácido determinantes para a interação com o inibidor e o impacto de substituições no desenvolvimento de resistência pode ser acessado considerando a dinamicidade natural da proteína e do inibidor por meio de simulações de ancoramento molecular combinadas com dinâmica molecular.

A simulação de dinâmica molecular utilizando mecânica molecular clássica visa estudar o movimento dos átomos (i) de um sistema, em um intervalo de tempo (t), através da resolução da equação do movimento de Newton para os “N” átomos que compõem o sistema, considerado as massas (m) de cada átomo, e a partir da resolução, a força de cada átomo (F_i) (Eq. 1). A resolução da equação do movimento e da derivada negativa da função do potencial (V) em relação a derivada da distância entre os átomos (Eq. 2), simultaneamente, em um pequeno passo de tempo (dt), permite conhecer as coordenadas de cada átomo que compõem o sistema. A equação de V é vinculada a um campo de força que descreve as características e o comportamento de cada átomo do sistema. As coordenadas salvas em função do tempo caracterizam a trajetória do sistema. A partir do conhecimento da trajetória, diferentes propriedades dos átomos, das moléculas e do próprio sistema podem ser conhecidas (ABRAHAM et al, 2023).

$$m_i \frac{d^2r_i}{dt^2} = F_i \quad i = 1 \dots N. \quad (1)$$

$$F_i = - \frac{dV}{dr_i} \quad (2)$$

A partir da dinâmica molecular é possível inferir sobre processos relevantes para contextos diversos. Estas simulações podem ser empregadas, por exemplo, para refinar dados de cristalografia de raio-X e ressonância magnética nuclear, no

cálculo de energia livre de biomoléculas, no design racional de drogas, no estudo de ancoramento molecular e no estudo de membranas e canais (HANSSON et al., 2002).

Ferramentas de modelagem molecular também podem ser empregadas em experimentos que permitam, por exemplo, o melhor entendimento da função proteica (XIA et al, 2013); a proporção dos resíduos de aminoácido que a compõem (GASTEIGER et al, 2005); a predição das características da cadeia lateral quanto ao índice hidropático (KYTE & DOOLITTLE, 1982); compreensão da interação de proteínas em complexos proteína-proteína (JONES et al., 1996); predição de cavidades proteicas (GUERRA et al, 2023); identificação de “hotspot” importantes para a interação da proteína-ligante (CURRAN et al, 2020); auxílio no design racional de fármacos na descoberta de novas drogas (LEACH et al, 2011); predição de poses de interação proteína-ligante e na estimativa da energia de interação (ELOKELY et al, 2013) e na predição de substituições de resíduos de aminoácido que desfavorecem a interação proteína-ligante (FREY et al, 2010; CAO et al, 2005).

Apesar do poder das ferramentas de modelagem molecular, há relativamente pouca aplicação em estudos na fitopatologia. Como exemplo, destaca-se o uso de dinâmica molecular e o ancoramento molecular (*molecular docking*) no estudo do mecanismo de *quorum sensing* em bactérias (JOSHI et al., 2021); na avaliação de enzima (beta-1,3-glucanase) de *Bacillus amyloliquefaciens* com potencial para o controle biológico de *Phytophthora meadii* (ABRAHAM et al., 2013); no design racional de moléculas com ação fungicida e oomicida (CROWLEY et al., 2008; ZHOU et al, 2015; KUNOVA et al., 2021); na identificação, caracterização e seleção de inibidores para um novo alvo molecular (BRESSO et al., 2016); no estudo e caracterização funcional de efetores de fungos e oomicetos (SARKAR et al., 2022 ; SEONG & KRASILEVA., 2023; LIU et al., 2024); na caracterização da resistência não hospedeira (BAHADUR & BASAK., 2012) e na caracterização de enzima com possível atividade contra patógenos e pragas (AYYAMPERUMAL et al., 2020).

A complexidade da avaliação da resistência de fitopatógenos a fungicidas/oomicidas carece da utilização de múltiplas estratégias. Os tradicionais ensaios de fenotipagem em laboratório e em casa de vegetação muitas vezes são sensíveis a apenas a uma porção da diversidade teórica da população, correndo o risco de serem pouco representativos da realidade. Estudos conjuntos que avaliam ensaios de laboratório, em casa de vegetação e também a bioquímica, a biologia

molecular, o custo de adaptabilidade (“fitness cost”) associado a mutações e estrutura de proteínas são de grande valia para enfrentar este tema (HOLLON, 2015).

Ferramentas de modelagem molecular podem ser úteis ao estudo do desenvolvimento de resistência em fitopatógenos a fungicidas/oomicidas, como no caso de *P. infestans* e zoxamida. A hipótese de que o uso de modelagem molecular pode acessar a diversidade proteica no sítio de interação e as alterações na interação proteína-inibidor, constituindo um meio para inferir o fenótipo e as possíveis penalidades associadas à adaptabilidade do patógeno é o cerne desta tese. É proposto que o uso de modelagem molecular pode contribuir para superar a dificuldade de fenotipar a diversidade teórica do patógeno e prever o risco de resistência.

3. Materiais e métodos

3.1. Obtenção de sequências de DNA de β -tubulina e α -tubulina de *P. infestans*.

As sequências proteicas da β -tubulina e da α -tubulina de *P. infestans* foram obtidas do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Como pré-requisito para a seleção das sequências, verificou-se o comprimento e a anotação. Para β -tubulina e α -tubulina as sequências selecionadas foram, respectivamente, AIG18518.1 e NCBI XP_002904194.1.

3.2. Construção dos modelos tridimensionais das proteínas β -tubulina e α -tubulina e avaliação da qualidade dos modelos preditos.

Utilizou-se o software de modelagem comparativa, Modeller (WEBB et al., 2014). Para a seleção do molde, o banco de dados “Protein Data Bank” foi consultado na busca de dados cristalográficos de β -tubulina e α -tubulina, de eucariotos. As melhores estruturas avaliadas quanto à resolução em Angstrom (Å), *outliers* na cadeia lateral e de Ramachandran, e *clashscore* foram selecionadas.

As sequências das proteínas de *P. infestans* selecionadas foram submetidas a alinhamento múltiplo no software Clustal W contra as sequências dos moldes obtidos no PDB. A estrutura com maior similaridade de sequência e melhor estrutura

tridimensional predita por cristalografia de raio-X foi utilizada como molde. Foram construídos 100 modelos de cada proteína de *P. infestans*. Os melhores modelos para cada proteína foram selecionados baseado nos indicadores internos do Modeller (Dope profile e GA341). Na sequência, realizou-se a inspeção visual com o auxílio do software PyMol (PyMOL, 2022) para buscar estruturas secundárias mal preditas. Adicionalmente, realizou-se, também, avaliação do valor de RMSD da sobreposição do modelo 3D com o molde obtido no PDB. Além dos modelos das proteínas individualizadas, foi construído o modelo do heterodímero α -tubulina- β -tubulina a partir do alinhamento estrutural de ambos os modelos individuais com o respectivo molde do PDB no software Pymol. Em todos os casos, adicionou-se o íon de Mg^{2+} e o respectivo nucleotídeo (GTP ou GDP) aos modelos das proteínas usando o PyMol.

3.3. Parametrização dos isômeros R-zoxamida e S-zoxamida e de GDP e GTP.

Para a parametrização dos ligantes inibidores, R-zoxamida e S-zoxamida, e dos nucleotídeos associados às tubulinas, GDP e GTP, foi utilizado o campo de força General Amber Force Field (WANG et al., 2004) versão 2 (GAFF2) com o tipo de carga RESP. A estrutura dos quatro ligantes foi obtida em arquivo tipo “.mol2” e as cargas foram calculadas no software Gaussian 09 revisão D.01 (FRISH et al., 2013) com o auxílio do software AmberTools23 (CASE et al., 2023) utilizando o método HF/6-31G* SCF=tight Test Pop=MK iop(6/33=2) iop(6/42=6) opt. O software AmberTools foi utilizado para extração dos resultados de cálculo quântico do software Gaussian, bem como para os seguintes passos: definição de cargas tipo RESP; atribuição de tipos de átomos do campo de força GAFF2; geração de parâmetros estruturais; e teste da qualidade de descrição das moléculas. Por fim, os valores dos parâmetros foram introduzidos em arquivos individuais de descrição dos ligantes em GAFF2 e estes convertidos com o AmberTools23, em arquivos compatíveis com o software GROMACS para serem executados em conjunto com o campo de força Amber99SB-ILDN. Adicionalmente, cada arquivo foi checado quanto à correta atribuição de tipo de átomo e posteriormente quanto à correta correspondência com a topologia gerada pelo software GROMACS.

3.4. Simulação de R-zoxamida e S-zoxamida em água e caracterização da população conformacional.

Os ligantes R-ZOX e S-ZOX foram simulados individualmente, em água, no software GROMACS para caracterização das populações conformacionais. Cada sistema foi composto de uma caixa cúbica contendo apenas o ligante e moléculas de água TIP3. As etapas de minimização, equilíbrio e da fase de produção foram feitas ajustando-se os arquivos de parâmetros de dinâmica molecular (*mdp*) (APÊNDICE A) tomando como base o tutorial de GROMACS (LEMKUL, 2019), o manual do GROMACS 2023.3 (ABRAHAM et al., 2023), as distância de corte para interações de curta distância eletrostática, lista de vizinhos e interações de van de Waals. As etapas foram ajustadas de acordo com os campos de força Amber 99SB-ILDN e GAFF2. As equilibrações foram simuladas em 1 nanosegundo e a fase de produção foi simulada por 2 microssegundos.

Para a caracterização da diversidade de conformações dos inibidores, cinco ângulos diedrais não redundantes foram selecionados em cada ligante e adicionados a um arquivo de índice com “*gmx make_ndx*”. Os ângulos foram extraídos da trajetória da fase de produção com a função “*gmx angle*”. Com o auxílio do software ConfiD (POLÊTO et al., 2020), a variação dos ângulos diedrais extraídas da trajetória foi agrupada e representada em termos de frequência de ocorrência da combinação dos ângulos em relação ao tempo de simulação, permitindo assim acessar as conformações assumidas pelos ligantes em solução.

3.5. Simulação da interação da zoxamida com a β -tubulina no heterodímero e caracterização da população conformacional do inibidor no sítio de interação.

Os isômeros da zoxamida foram adicionados no sítio proposto por Velasco-Saavedra et al. (2023) sem a adição da ligação covalente. Para tal, utilizou-se o software Autodock Vina (EBERHARDT et al, 2021). A ausência da ligação covalente teve por intuito estudar as interações proteína-ligante, bem como as transições conformacionais do ligante e da proteína durante o processo de interação. Cada sistema continha o heterodímero α -tubulina- β -tubulina com um dos isômero de zoxamida ligado à β -tubulina, e a adição dos átomos de Mg e de GDP no sítio E da β -tubulina, e de GTP no sítio N da α -tubulina. A água TIP3 foi utilizada

como solvente e íons sódio (Na) e Cloro (Cl) foram adicionados para neutralizar as cargas do sistema. Para a simulação foi utilizada uma caixa icosaédrica. Os arquivos *.mdp* foram os mesmos ajustados previamente com exceção do tempo de simulação da fase de produção alterado para 500 nanosegundos (ns). Os sistemas foram simulados em três repetições. Após a conclusão das simulações, a trajetória foi centralizada com a função “*gmx trjconv*” primeiramente com o uso da fleg “-pbc whole” seguido de “-pbc nojum” e por fim “-center -pbc mol -ur compac”. As quebras na molécula e saltos devido às condições periódicas de contorno foram removidas. Finalmente, centrou-se o sistema na caixa de simulação. Após a obtenção da trajetória centrada, os isômeros foram extraídos da simulação com o uso de “*gmx trjconv*”, as trajetórias das três repetições de cada isômero foram concatenadas com o uso de “*gmx trjcat*” formando uma nova trajetória de 1,5 microsegundos. A população conformacional dos isômeros da zoxamida foram analisadas como em 3.4. utilizando da trajetória concatenada. As conformações mais frequentes do inibidor no sítio foram comparadas àquelas oriundas da simulação em solução. O modo principal de reconhecimento molecular, ajuste induzido ou seleção conformacional (VÉRTESSY & OROSZ., 2010) no sítio de interação foi proposto de acordo com a comparação entre a semelhança da população conformacional no sítio contra aquela em solução.

3.6. Simulação do heterodímero na ausência do inibidor.

O sistema de simulação na ausência dos inibidores foi montado como descrito em 3.5. e simulados com três repetições. Após a obtenção da trajetória centrada, as funções “*gmx rms*” e “*gmx gyrate*” foram utilizadas para caracterizar a variação no RMSD das proteínas do heterodímero ao longo da trajetória e para calcular o raio de giro. Às trajetórias de cada repetição foram visualizadas no software VMD e as possíveis regiões mais flexíveis foram avaliadas. A manutenção das estruturas terciária dos monômeros e quaternária do heterodímero também foi checada. De cada trajetória extraiu-se uma nova contendo os resíduos de aminoácido presentes no sítio de interação da zoxamida e estas foram clusterizadas com a função “*gmx cluster*”. O RMSD entre os fragmentos proteicos de até 1 Å foi utilizado como valor de corte para o agrupamento das estruturas.

3.7. Simulação de substituições pontuais de resíduos de aminoácido no sítio de ligação da zoxamida.

Para as simulações da propensão de substituições pontuais de resíduos no sítio alvo da zoxamida na β -tubulina foi utilizado o software FoldX (SCHYMKOWITZ et al., 2005) associado ao MutateX (TIBERTI et al., 2022) que permite execuções em paralelo do FoldX e visualização gráfica dos resultados.

As posições na proteína importantes para a interação com o inibidor foram selecionadas com base nos resultados do item 3.4. e para cada posição executou-se a substituição do resíduo de aminoácido pelos 20 aminoácidos comumente encontrados em proteínas, incluindo o aminoácido original. Do resultado de uma repetição de simulação descrita em 3.6., 100 conformações do heterodímero foram selecionadas considerando intervalos regulares no tempo total de simulação. Após a seleção das estruturas, todas foram utilizadas simultaneamente no MutateX para o cálculo da variação da energia livre ($\Delta\Delta G$). A partir dos resultados do MutateX, mapas de calor com os valores de $\Delta\Delta G$ foram confeccionados para facilitar a visualização dos resultados.

3.8. Avaliação do impacto de substituições pontuais na β -tubulina na interação com os isômeros da zoxamida.

Para avaliar o impacto de substituições pontuais na interação de R-ZOX e S-ZOX foram construídos 10 sistemas heterodímero-isômero. Além do sistema com o heterodímero original, ou seja, sem alteração na sequência proteica, nove sistemas tiveram alterações pontuais apenas na β -tubulina. As alterações feitas em cada sistema foram: CYS239SER, CYS239ALA, CYS239THR, CYS239GLY, MET233ALA, MET233ILE, ASN247ALA, GLU198LYS e MET200TYR. As alterações CYS239SER, CYS239THR, CYS239GLY, MET233ILE, GLU198LYS e MET200TYR foram executadas devido a relatos prévios de resistência a zoxamida (CAI et al, 2015; CAI et al, 2016, ADNAN et al, 2018, PARACCHI et al, 2025). As alterações CYS239ALA, MET233ALA e ASN247ALA foram executadas para avaliar o impacto da troca do resíduo selvagem por um de cadeia lateral pequena e não carregado, com o intuito de identificar a necessidade do resíduo selvagem na posição. A troca dos resíduos de aminoácido foi feita no modelo proteico com o auxílio do Pymol

antes da construção do sistema de simulação no gromacs. As coordenadas iniciais dos isômeros no sítio de ligação bem como os demais passos de construção e simulação dos sistemas foram executados como em 3.5. Os sistemas foram simulados em triplicata. Após a conclusão das simulações, o complexo heterodimérico-inibidor foi centrado como descrito em 3.5. As ligações de hidrogênio na cadeia principal das proteínas, no esqueleto proteico, entre a proteína e o solvente e entre a proteína e o inibidor foram calculados ao longo da trajetória com o uso da função “*gmx hbond*”. Variações no RMSD do heterodímero e entre a cadeia principal do heterodímero e o inibidor foram calculados com a função “*gmx rms*”. O raio de giro do heterodímero foi calculado com a função “*gmx gyrate*”. Com o intuito de facilitar a visualização das interações específicas entre inibidor-resíduos da β -tubulina, empregou-se a função “*gmx cluster*” para agrupar os resíduos utilizados no estudo de saturação de substituição do item 3.7. com o inibidor. O RMSD entre os fragmentos proteicos de até 1 Å foi utilizado como valor de corte para o agrupamento das estruturas. As interações entre inibidor- resíduos- β -tubulina foram acessadas com o uso do VMD, Pymol e LigPlot (WALLACE et al, 1995).

4. Resultados

4.1. Modelo proteico.

O heterodímero α - β -tubulina PDB-4DRX (Fig.4) foi utilizado como molde. Os modelos selecionados, dentre os 100 produzidos, de α - tubulina e β -tubulina de *P. infestans* tiveram o valor de 1,000 para GA341 e os menores valores para o DOPE, métricas internas do Modeler que indicam a qualidade dos modelos. Os gráficos do DOPE-profile também indicaram o ajuste adequado dos modelos ao molde considerando cada resíduo de aminoácido (Fig. 4). Não foram encontradas regiões mal preditas. O RMSD calculado entre molde e modelo, considerando o heterodímero (Fig. 4), foi de 0,094 Å, indicando uma elevada similaridade estrutural entre ambos. Para a adição de GDP ao sítio E, a estrutura do GTP foi extraída da β -tubulina do molde e modificada no software Avogadro. Os nucleotídeos GTP e GDP foram adicionados ao modelo com o uso do Pymol nas mesmas posições contidas no molde.

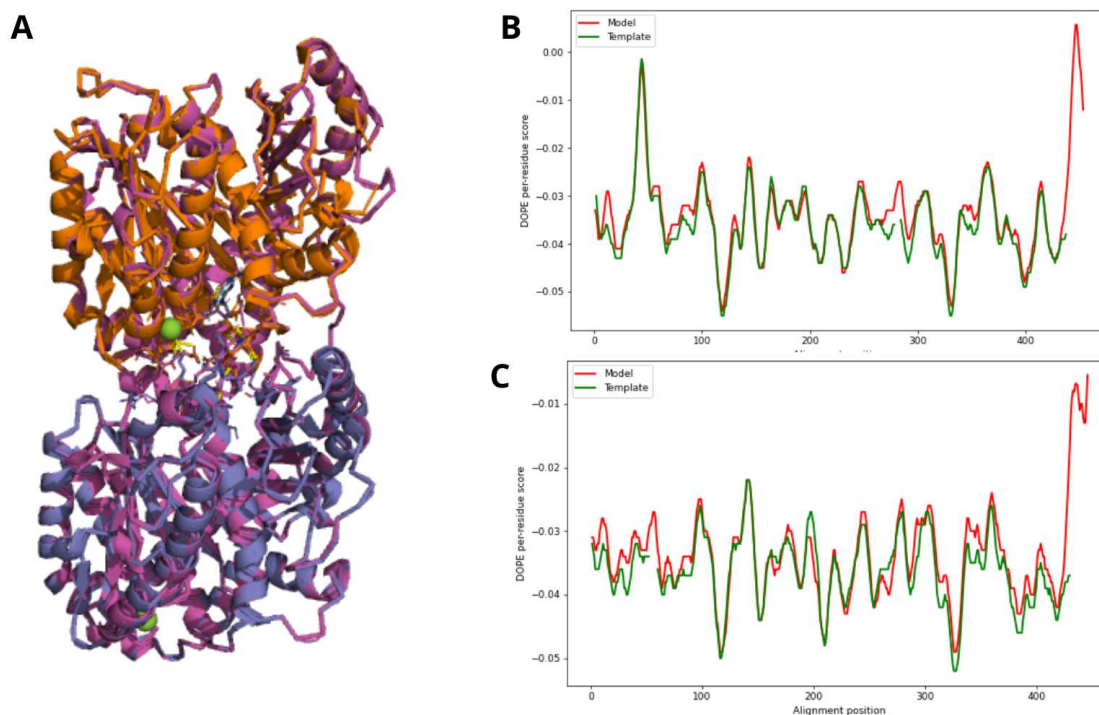


Figura 4. Representação em *cartoon* do alinhamento estrutural entre molde e modelo e gráficos do perfil DOPE. Heterodímero de α - β -tubulina de *Phytophthora infestans* em magenta, α -tubulina de *Bos taurus* em laranja e β -tubulina em azul ardósia (A). Perfil DOPE, por resíduos, molde e modelo para α -tubulina (B) e β -tubulina (C).

4.2. Caracterização populacional das conformações de R-ZOX e S-ZOX em solução.

As conformações de R-ZOX e S-ZOX em água TIP3 tiveram grande diversidade em sua população durante os 2 ms de simulação (Fig. 5). Considerando o número total de diferentes conformações para os cinco ângulos diedrais (Fig. 5B), os isômeros R-ZOX e S-ZOX apresentaram 129 e 172 conformações respectivamente.

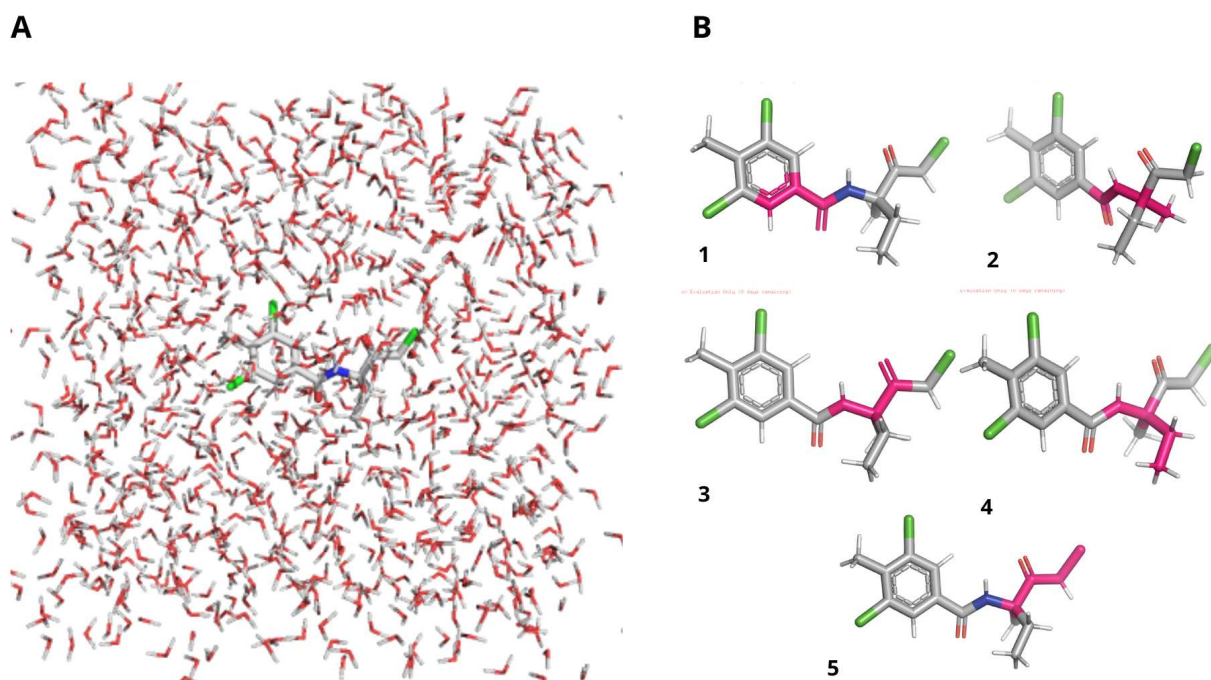


Figura 5. (A) Caixa de simulação contendo solvente (água TIP3) e R-zoxamida. (B) Representação dos átomos que formam os 5 diedros estudados (magenta). Em ambas ilustrações, oxigênio (vermelho), carbono (cinza), cloro (verde), nitrogênio (azul) e hidrogênio (branco) são representados em bastões.

Apesar do elevado número de conformações em solução, foi possível identificar conformações mais frequentes, 11 em R-ZOX (Fig. 6) e 13 em S-ZOX (Fig. 7), presentes em cerca de 90% do tempo na simulação.

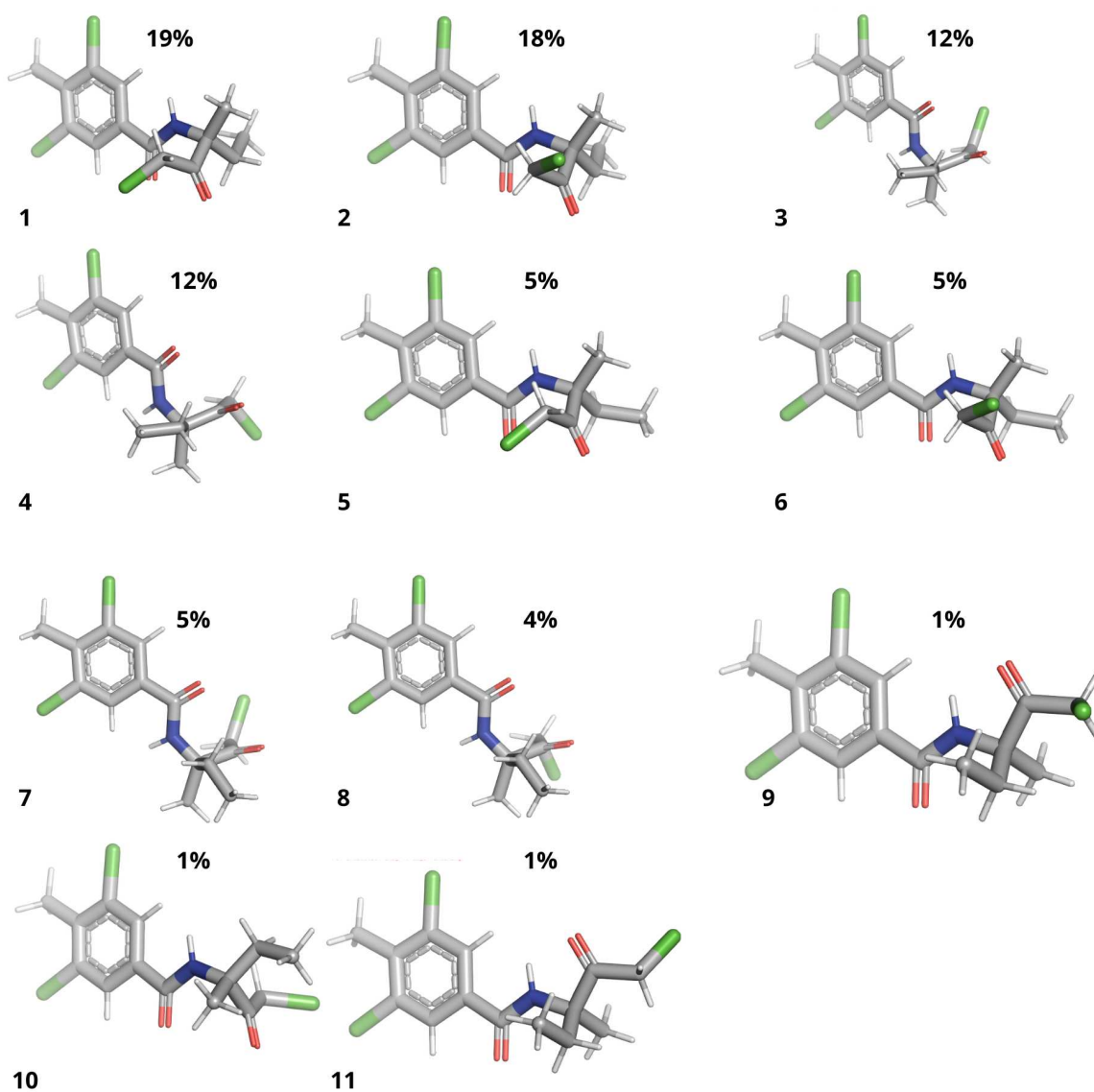


Figura 6. Representação em bastão das 11 conformações de R-zoxamida mais frequentes em solução (1-11) e a frequência de ocorrência em função do tempo total da simulação. Carbono (cinza), cloro (verde), oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul) e hidrogênio (branco) estão representados.

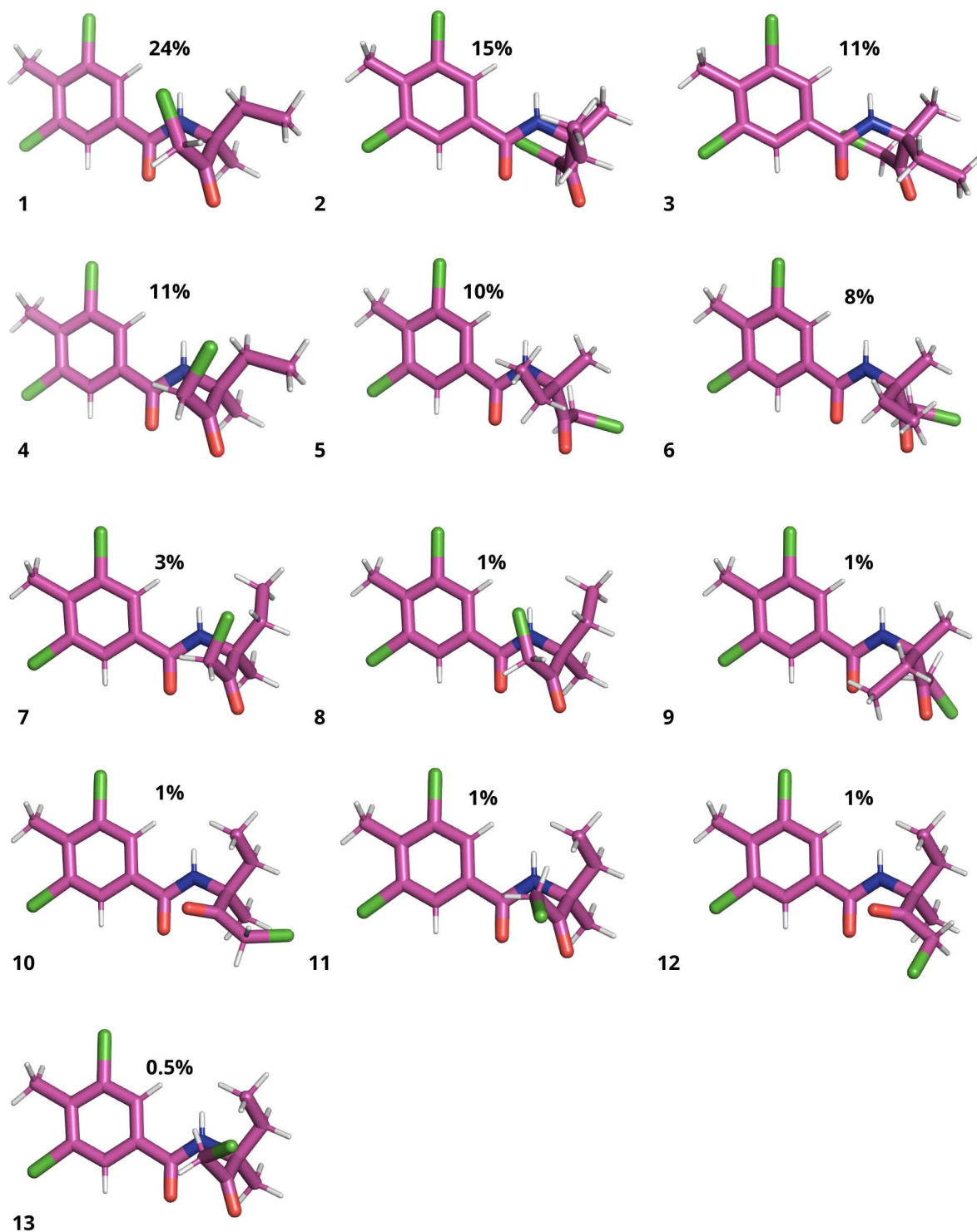


Figura 7. Representação em bastão das 13 conformações de S-zoxamida mais frequentes em solução (1-13) e a frequência de ocorrência em função do tempo total da simulação. Carbono (magenta), cloro (verde), oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul) e hidrogênio (branco) estão representados.

4.3. Caracterização populacional das conformações de R-ZOX e S-ZOX no sítio de inibição.

A análise de população de conformações dos isômeros de zoxamida no sítio de inibição (Fig. 8) revelou redução na flexibilidade de R-ZOX e S-ZOX no sítio de interação. Ao todo foram verificadas 87 conformações distintas para R-ZOX e 38 para S-ZOX. Do total de conformações no sítio, 22 foram mais frequentes em R-ZOX e oito em S-ZOX. Menor flexibilidade de S-ZOX foi observada no sítio de interação.

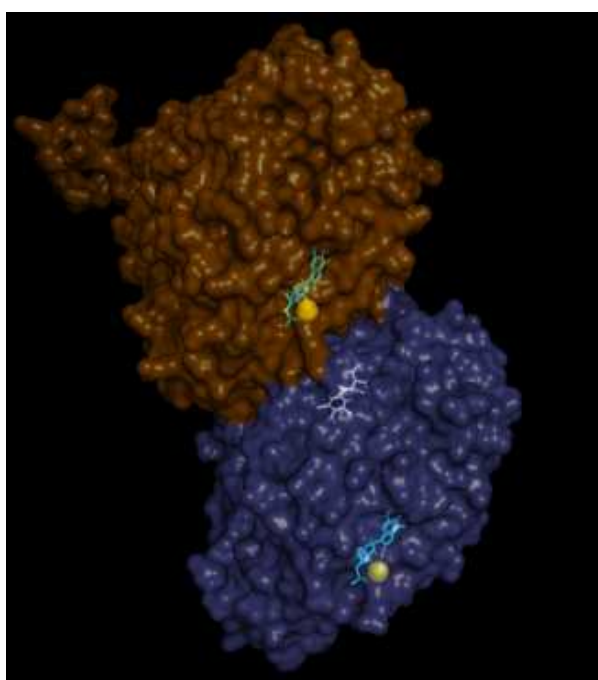
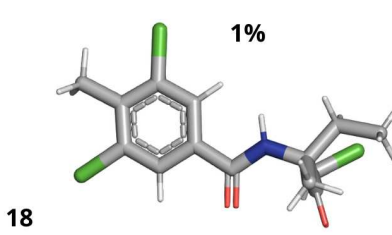
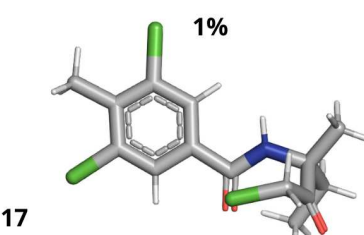
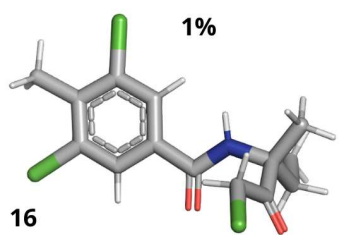
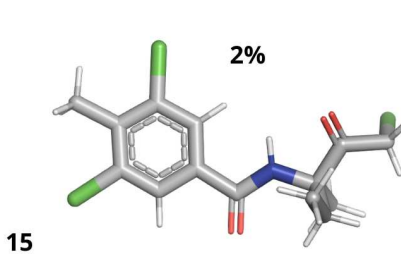
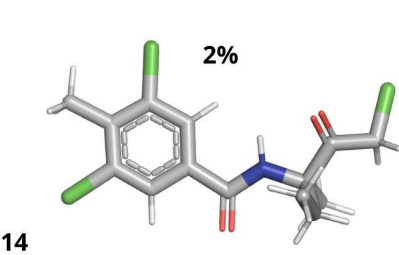
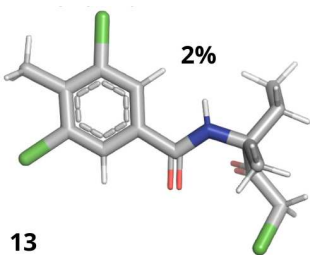
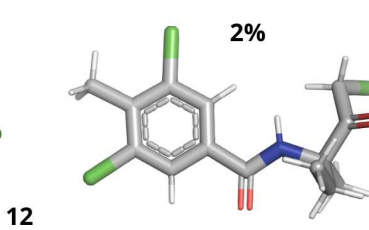
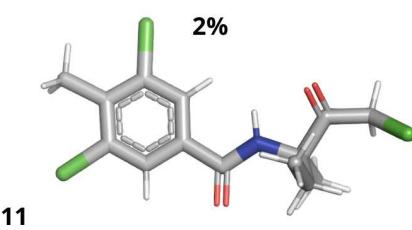
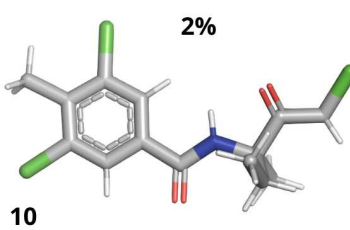
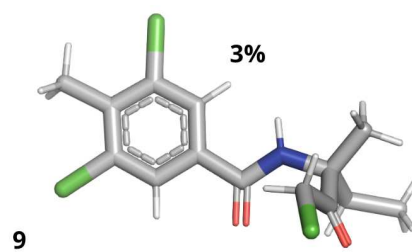
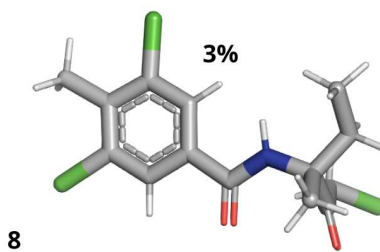
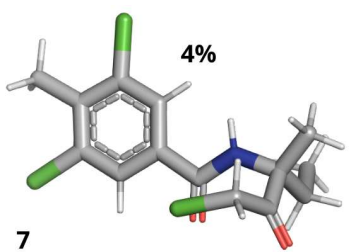
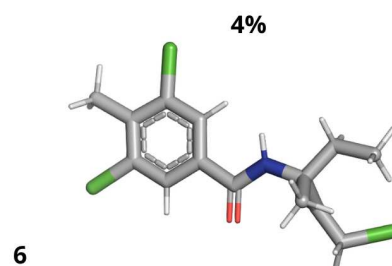
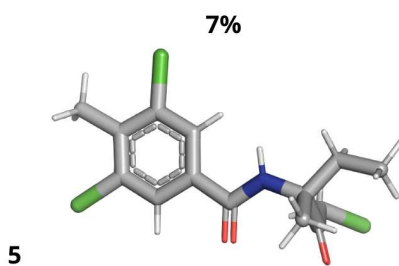
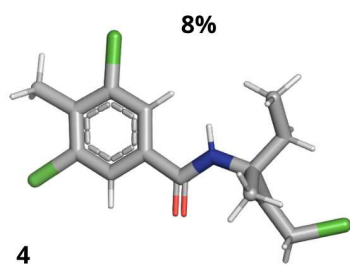
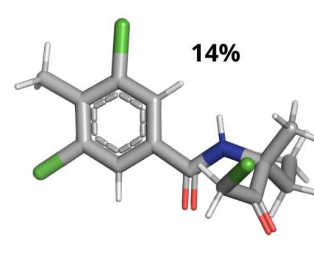
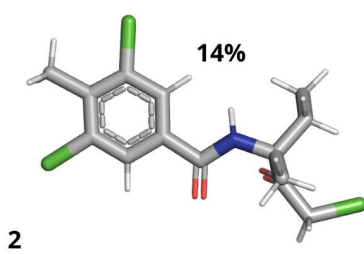
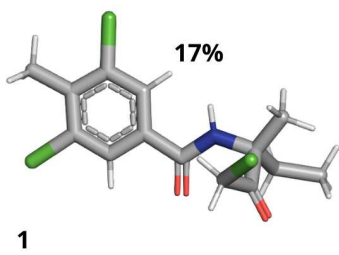


Figura 8. Heterodímero de α - β -tubulina de *Phytophthora infestans* com R-zoxamida no sítio de inibição. Proteínas, α -tubulina (laranja) e β -tubulina (azul ardósia), representadas em superfície. Nucleotídeos (ciano) GTP e GDP nos sítios N e E, respectivamente, representados em bastão, acompanhados dos átomos de magnésio (amarelo). R-zoxamida (cinza) no sítio de inibição na β -tubulina, representado em bastão.

Além da menor flexibilidade, o isômero S-ZOX apresentou uma conformação majoritária com frequência de aproximadamente 45% (Fig. 10), o que não ocorreu em R-ZOX (Fig. 9), onde as três conformações mais frequentes apresentam frequências individuais inferiores a 18%.



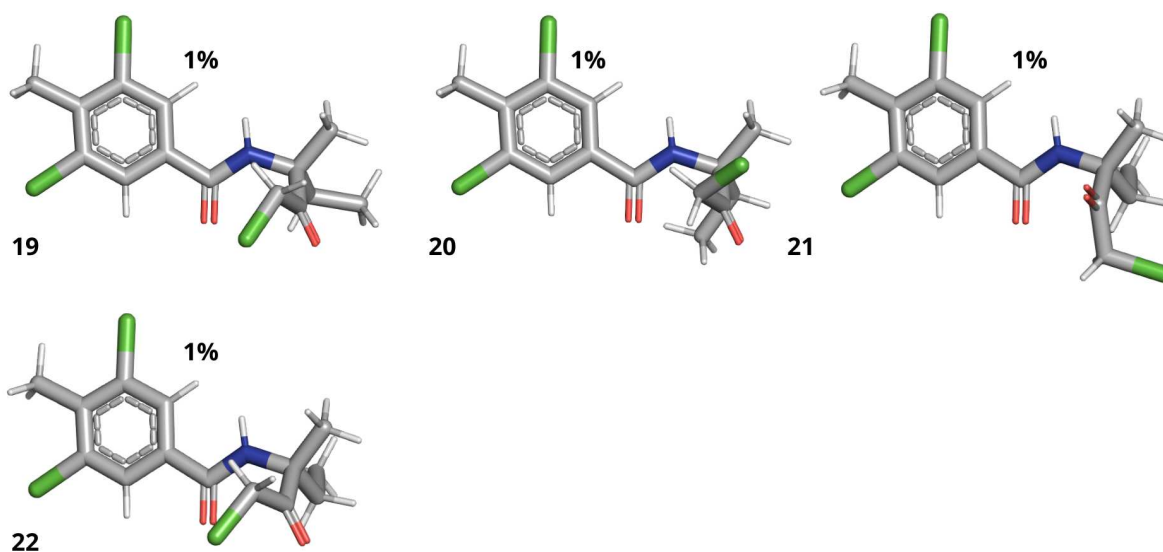


Figura 9. Representação em bastão das 22 conformações de R-zoxamida mais frequentes em solução (1-22) e a frequência de ocorrência em função do tempo total da simulação. Carbono (cinza), cloro (verde), oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul) e hidrogênio (branco) estão representados.

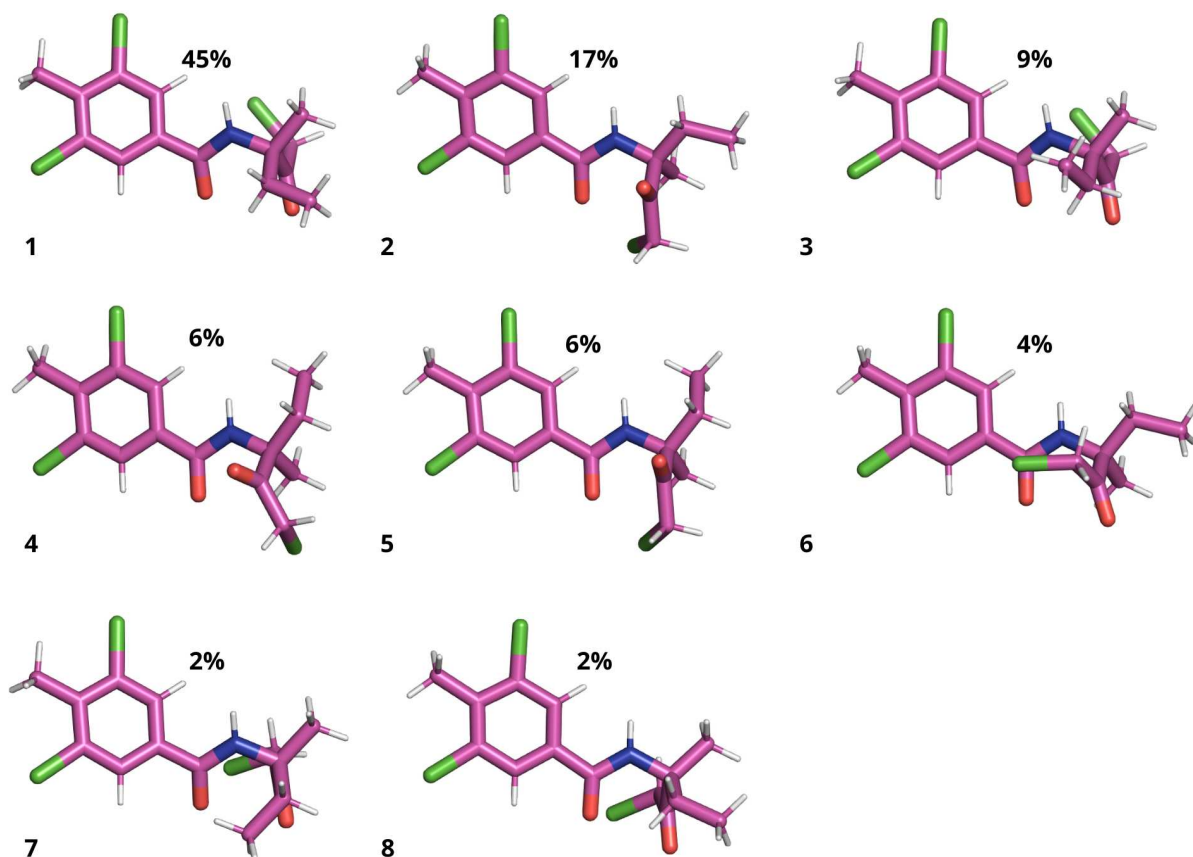


Figura 10. Representação em bastão das oito conformações mais frequentes de S-zoxamida (1-8) e a frequência de ocorrência em função do tempo total da simulação.

Carbono (magenta), cloro (verde), oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul) e hidrogênio (branco) estão representados.

4.4. Variação conformacional do sítio de interação da zoxamida no heterodímero na ausência e na presença do inibidor.

As simulações do heterodímero na presença dos inibidores não apresentou diferenças quanto à flutuação das ligações de hidrogênio envolvendo as proteínas e o solvente, cadeia lateral dos resíduos de aminoácido, ou no esqueleto proteico. Alterações conformacionais em regiões distantes do sítio de interação β -tubulina-zoxamida foram exclusivas para as regiões de *loop* mais flexíveis da proteína. Ao longo das simulações não foi observada depolimerização do heterodímero. A comparação estrutural do sítio de interação (Fig. 11) pela sobreposição das estruturas agrupadas na presença e ausência do ligante não revelaram transições conformacionais que alterassem o sítio de interação como, por exemplo, por meio da perda de estrutura secundária. Parte das sobreposições revelaram pequena variação espacial no esqueleto protéico entre os sítios simulados (Fig. 11C, 11D e 11H). Em parte das estruturas (Fig. 11B, 11E, 11F e 11G) houve maior variação em *loops* que unem α -hélices na β -tubulina, na região da interface com α -tubulina. O sítio de inibição na presença do inibidor apresentou uma maior compactação em comparação ao ausente do inibidor.

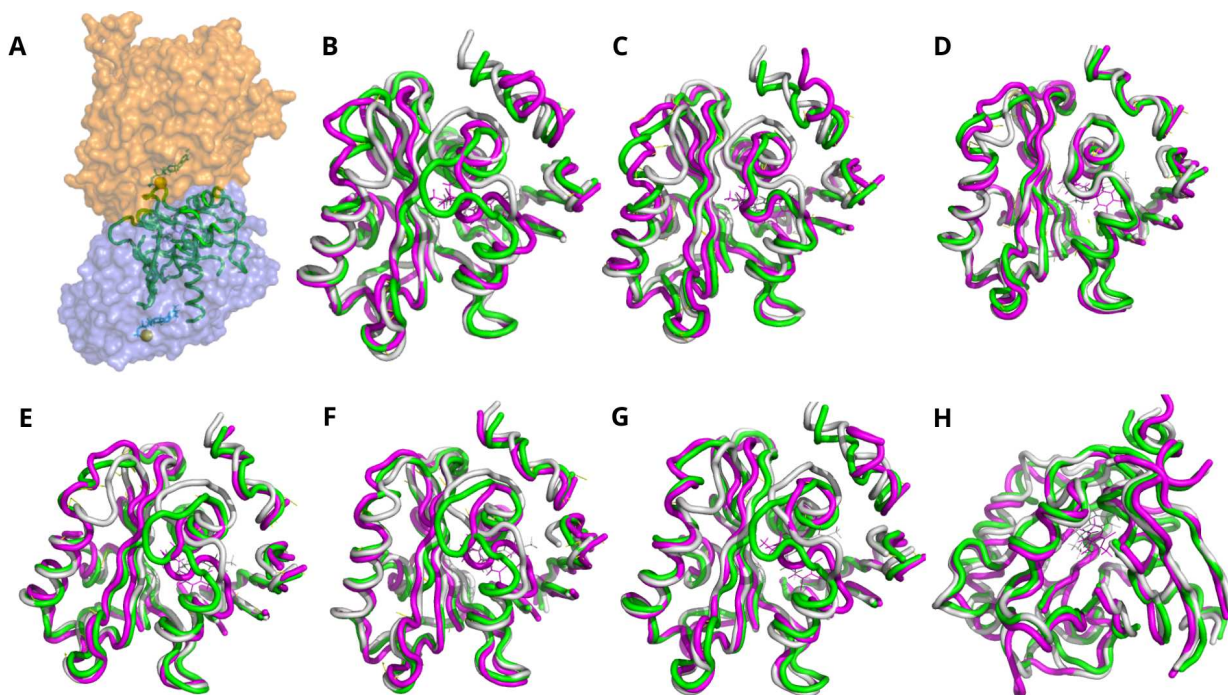


Figura 11. Região do sítio de interação da zoxamida na β -tubulina. Heterodímero contendo α -tubulina (laranja) e β -tubulina (azul ardósia) representados em superfície e a região do sítio da zoxamida (verde) representado em *cartoon* (A). Sobreposição do sítio com estruturas do agrupamento da simulação na ausência de zoxamida (verde), na presença de R-zoxamida (cinza) e na presença de S-zoxamida (magenta).

4.5. Simulação de substituições pontuais de resíduos de aminoácido no sítio de ligação da zoxamida

Substituições que resultaram na variação da energia livre menor ou igual ao valor do resíduo selvagem foram consideradas estabilizadoras para a estrutura proteica. Substituições com $\Delta\Delta G$ superior ao do resíduo selvagem foram consideradas como desestabilizadoras da β -tubulina. Como as conformações utilizadas para a saturação de substituição foram oriundas de estruturas de β -tubulina dimerizadas no heterodímero, as substituições desestabilizadoras foram consideradas com potencial para diminuir a estabilidade do heterodímero.

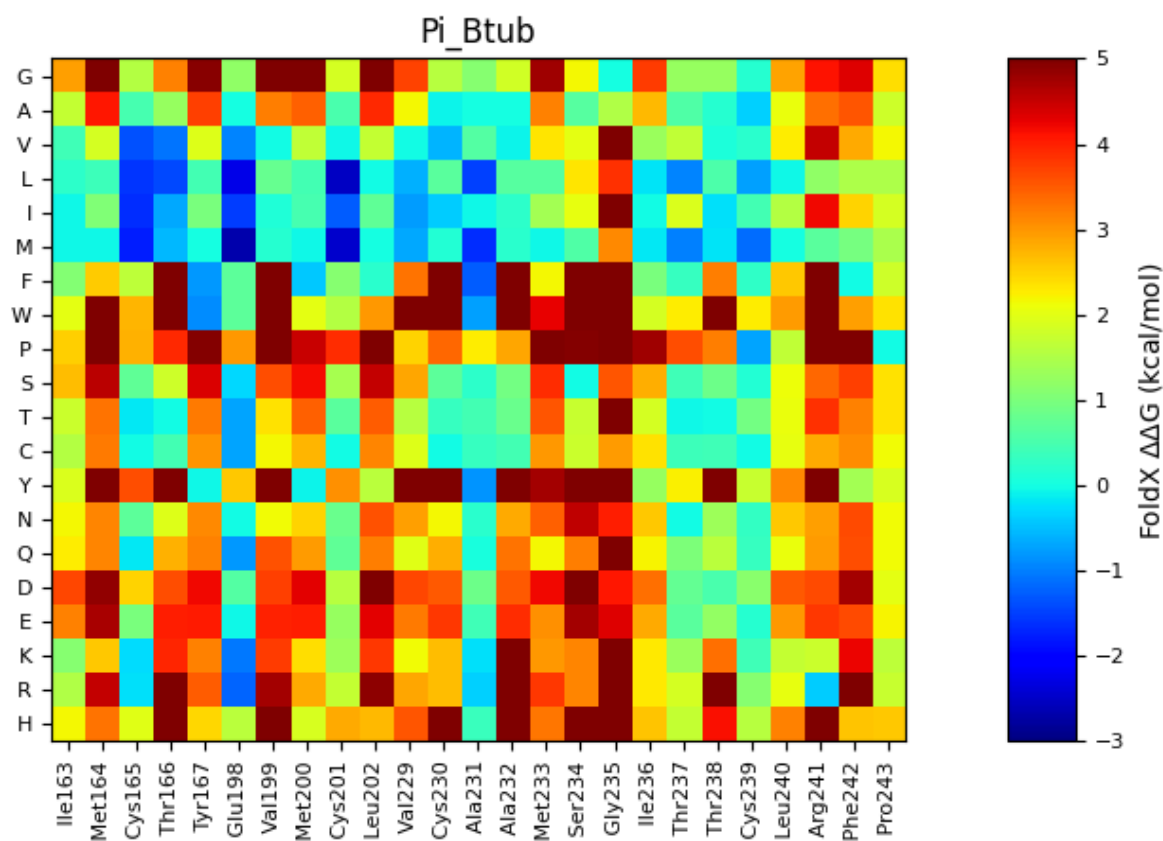


Figura 12. Impacto da substituição de resíduos no modelo da β -tubulina de *Phytophthora infestans*. Valor da variação da energia livre ($\Delta\Delta G$ s) estimada para uma substituição por um aminoácido (eixo y) em uma determinada posição (eixo x) usando o MutateX. Os valores da diferença na energia livre variam de -3 a 5 kcal/mol.

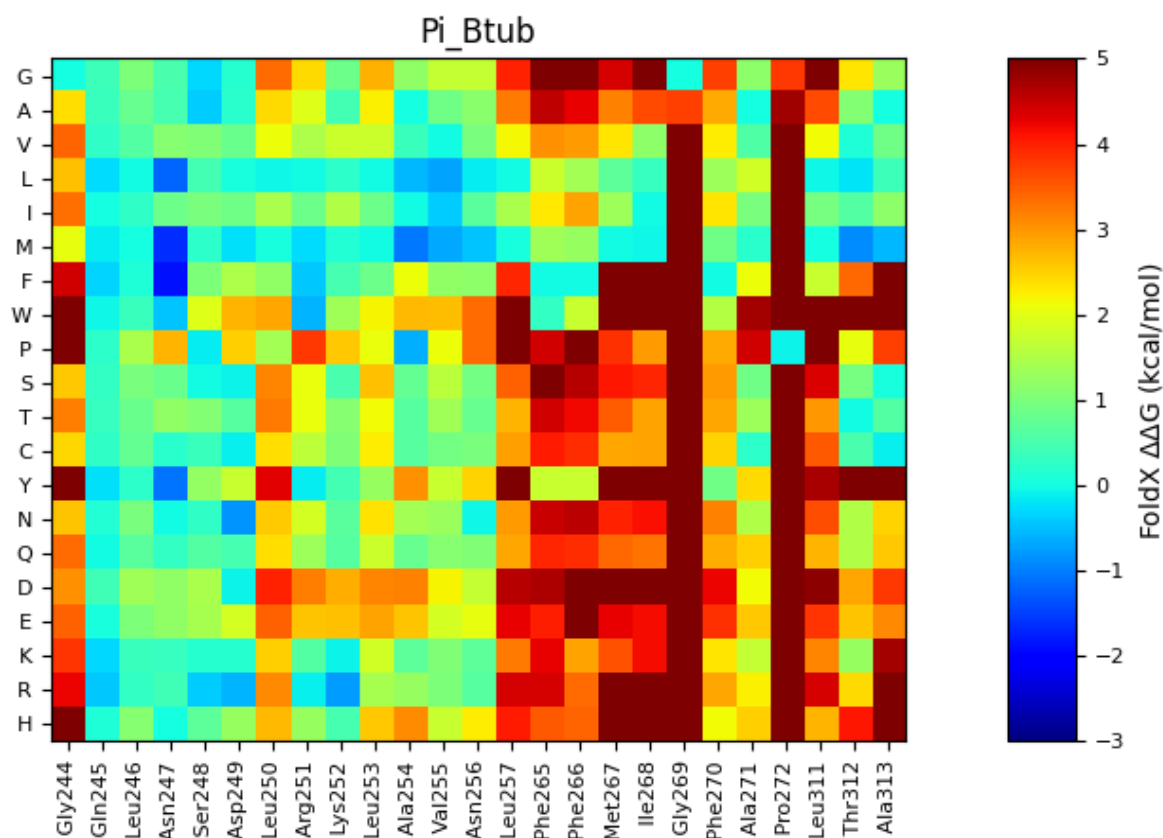


Figura 13. Impacto da substituição de resíduos no modelo da β -tubulina de *Phytophthora infestans*. Valor da variação da energia livre ($\Delta\Delta G$ s) estimada para uma substituição por um aminoácido (eixo y) em uma determinada posição (eixo x) usando o MutateX. Os valores da diferença na energia livre variam de -3 a 5 kcal/mol.

Dentre as 71 posições analisadas (Figs. 12 a 14) quanto à manutenção da estabilidade protéica, observou-se: em 25 posições apenas o resíduo selvagem foi suportado; em 18 posições de dois a três resíduos foram suportados; em 19 posições, quatro a seis resíduos foram suportados; e em nove posições, sete a 15 resíduos foram suportados. No total, houve possibilidade de ocorrência de 243 substituições que aumentam a estabilidade da estrutura da β -tubulina.

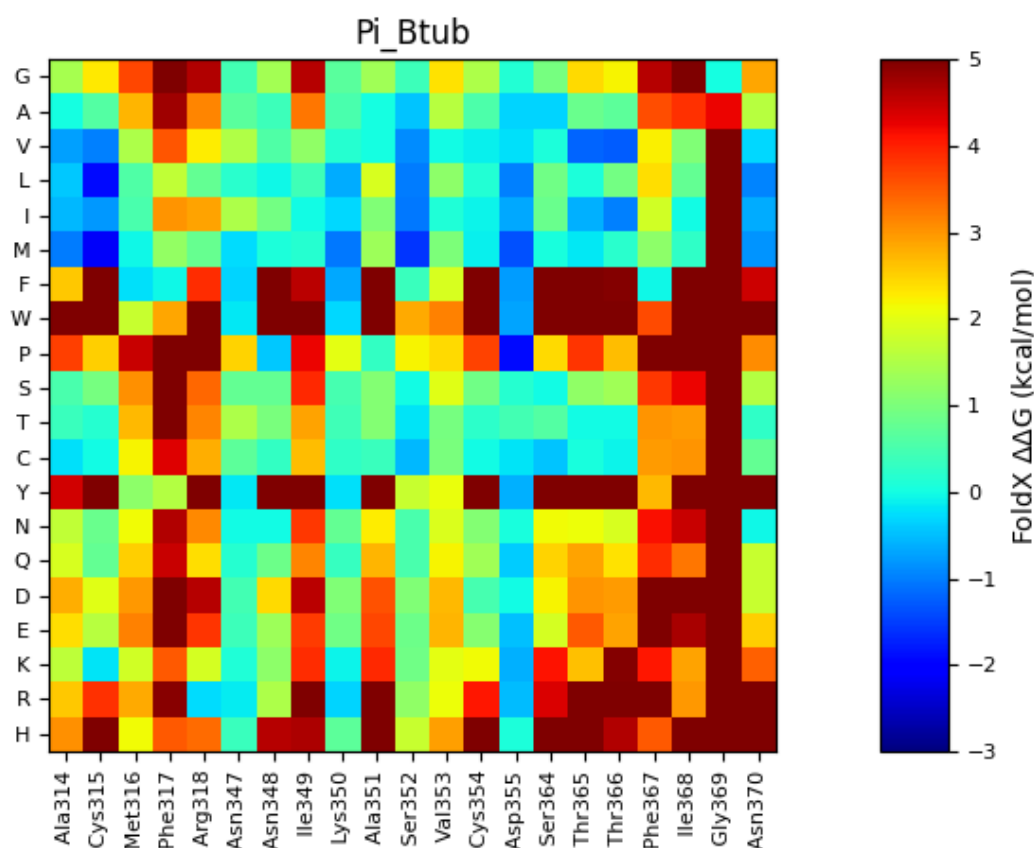


Figura 14. Impacto da substituição de resíduos no modelo da β -tubulina de *Phytophthora infestans*. Valor da variação da energia livre ($\Delta\Delta G$ s) estimada para uma substituição por um aminoácido (eixo y) em uma determinada posição (eixo x) usando o MutateX. Os valores da diferença na energia livre variam de -3 a 5 kcal/mol.

4.6. Avaliação do impacto de substituições pontuais na β -tubulina na interação com os isômeros da zoxamida.

Para caracterização da interação de R-ZXO e S-ZOX no sítio de ligação foram executadas 10 simulações de dinâmica molecular para cada isômero, com três repetições. Dentre as simulações, nove foram executadas considerando a substituição pontual de um resíduo de aminoácido e uma foi feita considerando a proteína sem alteração. Não foi verificada, por inspeção visual da trajetória no VMD, em nenhuma das repetições, a dissociação do heterodímero. A visualização do RMSD do heterodímero ao longo da trajetória não indicou instabilidade do sistema (APÊNDICE B). As maiores variações no RMSD foram restritas a algumas repetições e podem ser explicadas por uma região de loop que apresentou elevada

flexibilidade ao longo da simulação. Este resultado foi considerado como esperado devido à dinamicidade da proteína.

O conteúdo de ligação de hidrogênio entre esqueleto da proteína, cadeia lateral proteica e na interface proteína-solvente (Fig. 15) não apresentou variações entre as simulações que pudessem discriminar o impacto das substituições pontuais. Por outro lado, o número de ligações de hidrogênio entre isômero e sítio de ligação variou ao longo das simulações, bem como o número e a frequência dos aceptores e doadores da ligação. A flexibilidade do ligante e a orientação no sítio também variaram entre as simulações e entre os ligantes (Fig. 16).

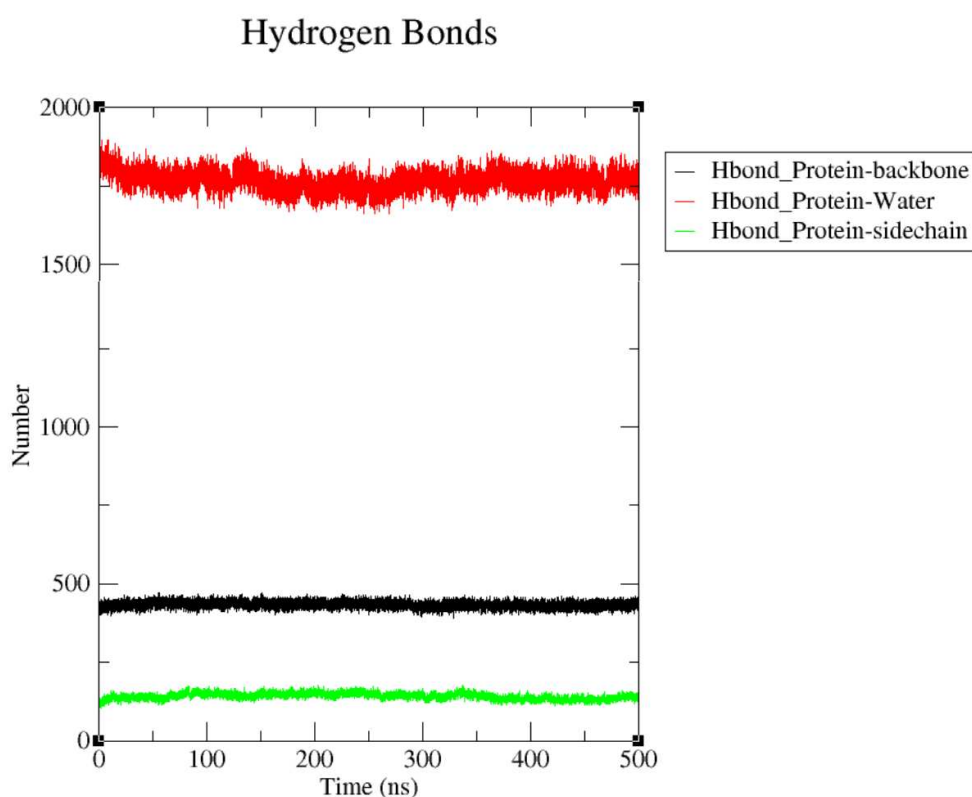


Figura 15. Perfil da variação no número de ligações de hidrogênio em uma repetição de simulação do heterodímero selvagem com R-zoxamida. Ligações de hidrogênio entre proteína e solvente (vermelho), resíduos de aminoácido do esqueleto proteico (preto) e entre os resíduos da cadeia lateral das proteínas (verde) em função do tempo total de simulação.

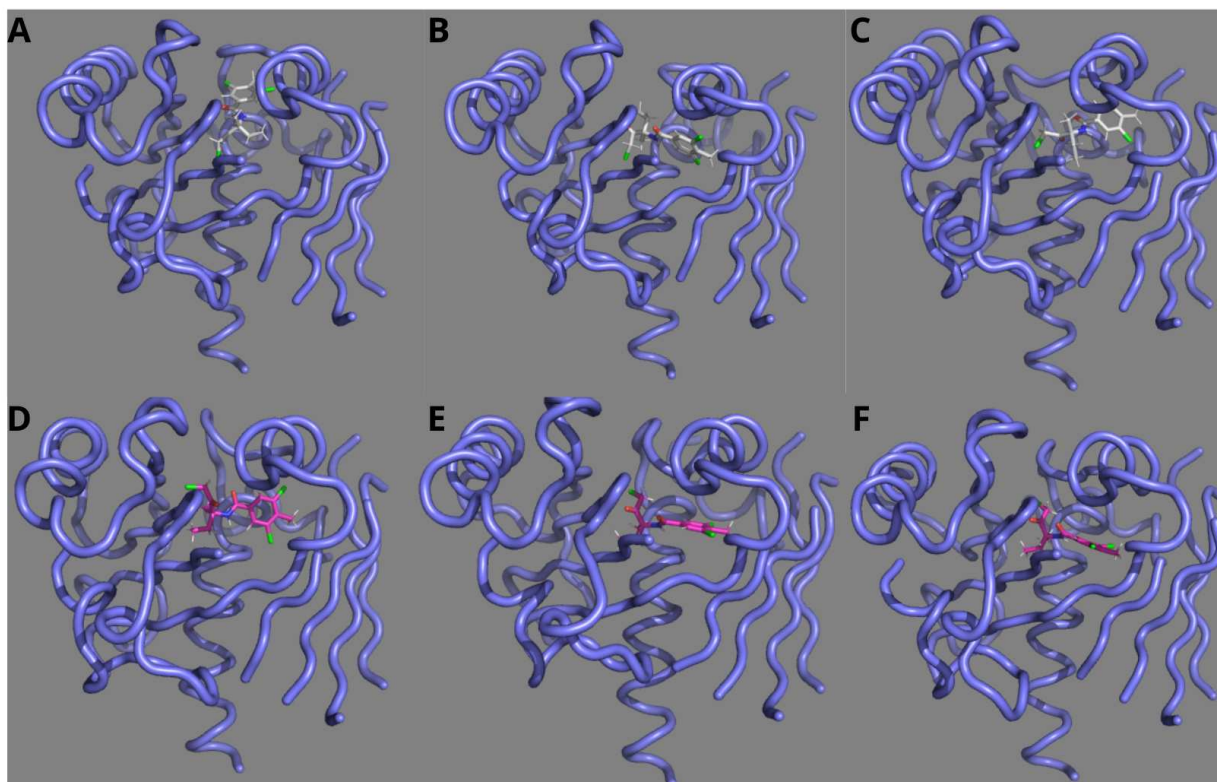


Figura 16. Orientação de R-zoxamida (superior) e S-zoxamida (inferior) no sítio de ligação da proteína representada em *cartoon* (azul ardósia) em três tempos selecionados para cada uma das repetições (**A-C** e **D-F**) na ausência de substituições pontuais.

Considerando os três principais parceiros de ligação de hidrogênio entre inibidor e sítio de ligação, para as simulações ausentes de substituição CYS239, ASN247 (Fig. 17) e SER352 foram os principais doadores de ligação de hidrogênio para R-ZOX e ILE236 o principal receptor. Na simulação com S-ZOX CYS239, ASN247 e LEU253 foram os principais doadores de ligação e ILE236 o principal receptor (Fig. 18 e APÊNDICE B). Além dos parceiros principais de interação, outros resíduos interagiram com ambos os isômeros com menor frequência.

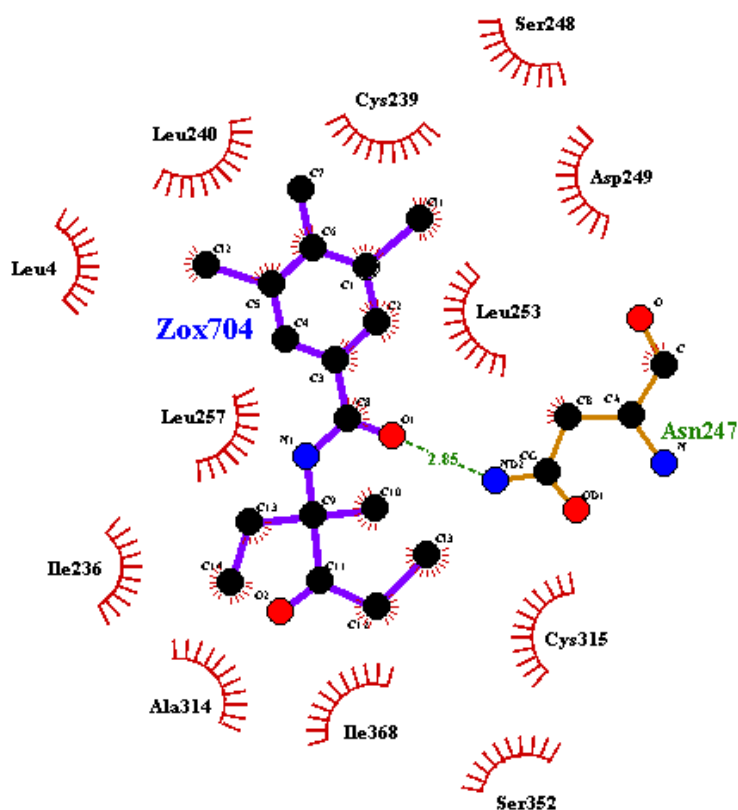


Figura 17. R-zoxamida e resíduos interagentes no sítio de ligação. Destaque para ligação de hidrogênio (linha verde tracejada) entre oxigênio de R-zoxamida (vermelho) e nitrogênio da ASN247. Os demais resíduos representados pelo código de três letras possuem interação hidrofóbica com o inibidor.

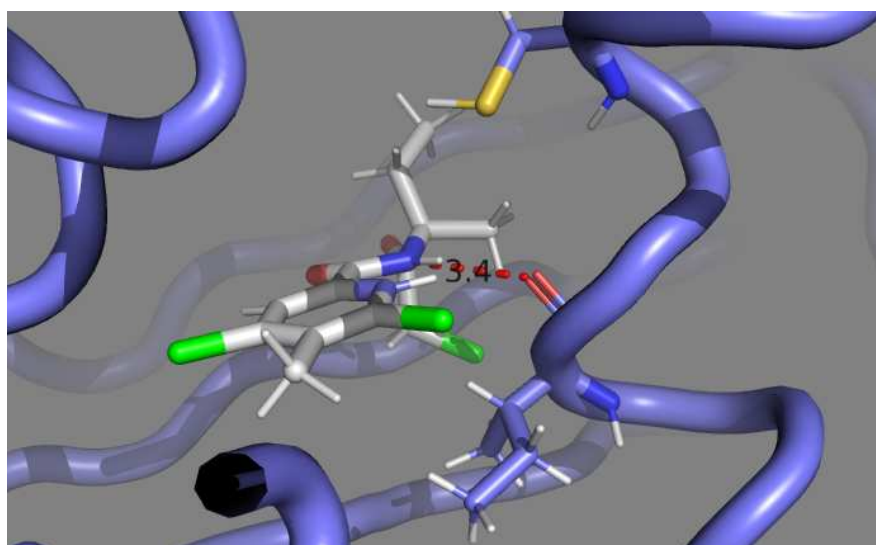


Figura 18. Ligação de hidrogênio entre R-zoxamida e ILE236. Destaque para ligação de hidrogênio (linha vermelha tracejada) entre nitrogênio (azul) de R-zoxamida e oxigênio (vermelho) de ILE236. R-zoxamida, ILE236 e CYS239 representados em bastão.

Nas simulações com substituição de resíduos, a frequência de ligações de hidrogênio e os parceiros de interação variaram. Em todas as simulações contendo substituições, interação entre zoxamida e ILE236 esteve presente, no entanto para as substituições CYS239SER e MET200TYR este parceiro de interação foi menos frequente quando interagindo com R-ZOX. A interação com ASN247 também esteve presente na maioria das simulações, no entanto no caso da substituição ASN247ALA a interação foi reduzida a ocupar poucos quadros da trajetória de simulação. À exceção das simulações GLU198LYS, MET233ILE e CYS239ALA, para ambos os isômeros, e ASN247ALA para S-ZOX, foi observada ligação de hidrogênio entre CYS239 e inibidor dentre as mais frequentes.

Quando consideramos uma ligação de hidrogênio com maior frequência e exclusiva de um grupo de simulações, este evento ocorreu em: MET200TYR, para ambos isômeros, com o resíduo CYS315; CYS239GLY, para S-ZOX, com o resíduo LEU246; CYS239SER, para R-ZOX, com o resíduo GLY235; e em GLU198LYS, para R-ZOX, com o resíduo THR366.

Os resíduos que possuem interações hidrofóbicas com os isômeros no sítio de ligação também variaram ao longo das trajetórias e entre as simulações (APÊNDICE C). Parte dos resíduos que possuem ligação de hidrogênio com o inibidor podem interagir hidrofobicamente em determinados momentos da trajetória, como no caso de ILE236, CYS239, LEU240, LEU 257, ALA314 e SER 352 na simulação de R-ZOX na proteína selvagem (Fig. 17).

Na avaliação das interações de R-ZOX na proteína selvagem no Pymol, foi possível verificar a ocorrência de uma possível ligação de halogênio envolvendo o oxigênio do esqueleto proteico de THR366 e um dos átomos de cloro da zoxamida (Fig. 19), a angulação e a distância de interação foram mantidas em parte dos quadros das simulações, uma possível ligação também foi verificada entre um dos átomos de cloro S-ZOX e o oxigênio do esqueleto proteico de CYS315 (Fig. 20).

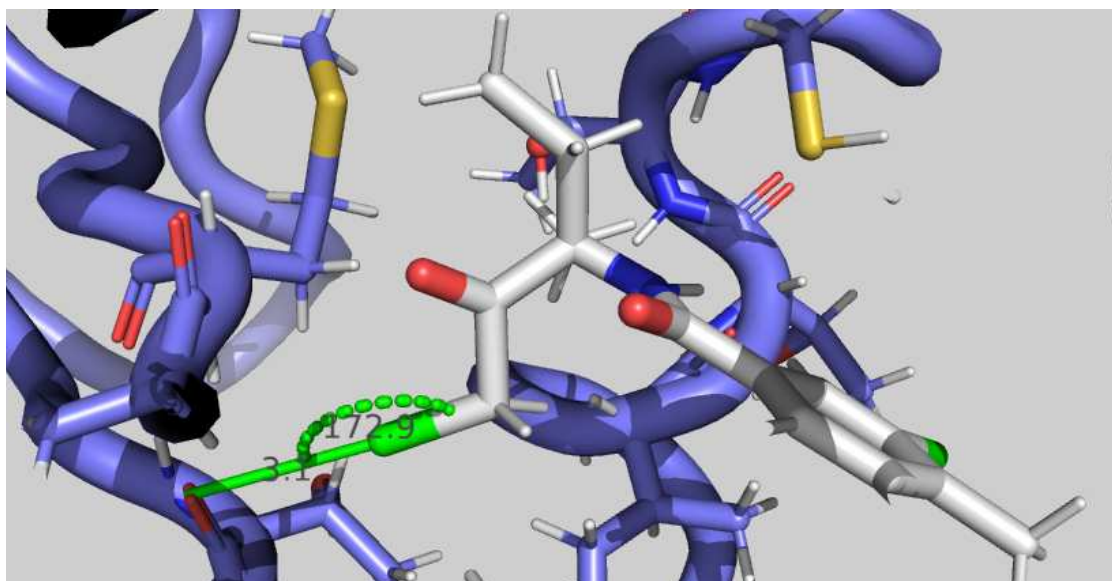


Figura 19. Ligação de halogênio entre R-zoxamida e THR366. Destaque para ligação de halogênio, quanto a distância (linha verde contínua) e angulação (linha verde tracejada), entre cloro (verde) de R-zoxamida e oxigênio (vermelho) de THR366. R-zoxamida, THR366 e alguns resíduos do sítio representados em bastão e proteína representada em cartoon.

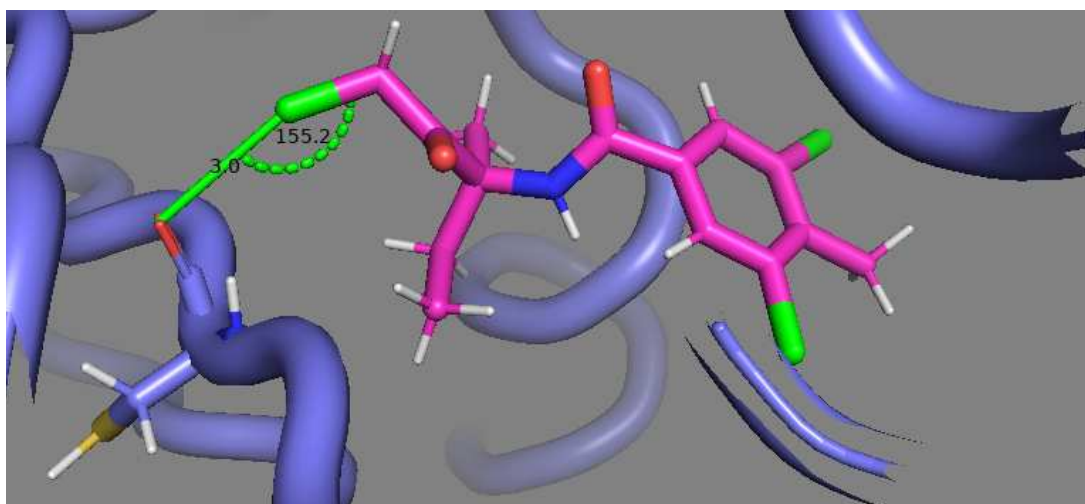


Figura 20. Ligação de halogênio entre S-zoxamida e CYS315. Destaque para ligação de halogênio, quanto a distância (linha verde contínua) e angulação (linha verde tracejada), entre cloro (verde) de S-zoxamida e oxigênio (vermelho) de CYS315. S-zoxamida e CYS315 representados em bastão e proteína representada em cartoon.

5. Discussão

Apesar da grande relevância dos estudos de fenotipagem de *P. infestans* quanto à resistência a oomicidas, em campo e em laboratório, esta é uma tarefa laboriosa e desafiadora do ponto de vista técnico. Há grandes dificuldades práticas de se trabalhar com oomicetos, o que pode limitar o acesso à diversidade real de uma população, subestimando os fenótipos existentes quanto à resistência (FRY et al, 2015). Além disso, a ação dos mecanismos evolutivos capazes de aumentar a variabilidade genética de uma população, mutação e fluxo gênico, contribuem para o incremento do número de genótipos na população, mas que não necessariamente pode ser acessada pelas limitações operacionais impostas pela abordagem da fenotipagem clássica (McDONALD & LINDE, 2002). Nesse contexto, a modelagem molecular oferece uma alternativa poderosa para explorar a “diversidade teórica” de possíveis mutações e seu impacto funcional, ampliando as perspectivas para o monitoramento da resistência.

Neste estudo, a saturação de substituição foi utilizada para entender a diversidade teórica que indivíduos de *P. infestans* podem assumir sem comprometimento da estabilidade da β -tubulina. Na região avaliada, cerca de 18% dos resíduos, considerando o resíduo da “sequência selvagem”, podem ser substituídos sem comprometimento estrutural, mantendo a estabilidade requerida para a atividade de uma proteína (TYZACK et al, 2017). No entanto, o FoldX não é capaz de considerar a totalidade do contexto protéico como, por exemplo, o componente de estabilidade fornecido aos filamentos de microtúbulo pela associação lateral entre eles (FEDOROV et al, 2019). Assim, parte das substituições aqui apresentadas como desestabilizadoras poderão ter um impacto diferente no contexto celular, sendo suportadas pela proteína sem comprometimento em sua função. Por outro lado, foi verificada pequena variação conformacional nos estudos de flexibilidade do sítio de ligação de zoxamida. Neste caso, parece plausível supor que substituições que aumentem a flexibilidade do sítio, como as desestabilizadoras, tenham uma importância local no desenvolvimento de resistência. As substituições MET233ILE em *Botrytis cinerea*, CYS239SER/THR/GLY em *Plasmopara viticola*, CYS239SER em *P. sojae*, e a ocorrência natural de SER239 em *Pythium aphanidermatum* resultaram em resistência, e em *P. infestans* foram preditas como “pouco” desestabilizadoras (CAI et al, 2015; CAI et al, 2016, PARACCHI et al, 2025)

o que parece concordar com esta hipótese. Neste sentido para ASN247ALA, introduzida neste estudo devido à ligação de hidrogênio entre os dois monômeros no heterodímero, e M233A (também introduzida neste estudo), ambas classificadas como desestabilizadoras, a resistência é antecipada. Considerando que a posição 247 é importante para a interação no heterodímero, ASN247ALA poderá ser acompanhada de penalidade na função proteica, por uma provável desestabilização do heterodímero nesta região.

É possível também que parte das substituições estabilizadoras possam reduzir a flexibilidade local do sítio, e por este evento, também resultar em resistência. Esta hipótese encontra suporte no caso de mutações nas posições 198 e 200. Em 198, tanto em *P. infestans* quanto em *B. cinerea*, ocorre GLU198. Na posição 200, têm-se MET200 em *P. infestans* e PHE200 em *B. cinerea*. As substituições LYS/ALA198 e TYR200 em *P. infestans* foram preditas como estabilizadoras, mas em *B. cinerea*, onde ocorrem, resultam em resistência (CAI et al, 2015; ADNAN et al, 2018). Curiosamente, as substituições GLU198LYS/ALA não estão associadas a penalidades severas na adaptabilidade de *B. cinerea*, mas por outro lado possuem menor prevalência no campo, comparado ao tipo selvagem (FEI et al, 2022). Partindo destas previsões, a substituição adicionada neste estudo, CYS239ALA, predita como estabilizadora poderá implicar em resistência, sem penalidade a adaptabilidade.

Neste trabalho, buscou-se avaliar a flexibilidade do ligante e o modo de ligação como características importantes para compreender melhor a inibição e o desenvolvimento de resistência. R-ZOX apesar de mais flexível no sítio (Fig. 9) do que em solução (Fig. 6), não apresentou sobreposição entre as conformações mais frequentes. O mesmo foi observado para S-ZOX que apresentou maior flexibilidade em solução (Fig. 7) do que no sítio (Fig. 10) onde inclusive uma conformação majoritária pode ser distinguida (Fig. 10.1). Considerando a definição clássica (VÉRTESSY & OROSZ., 2010), seleção conformacional e ajuste induzido são dois eventos independentes, no entanto, atualmente ambos são considerados como parte de um mesmo evento complexo responsável pela manutenção da interação proteína ligante (VOGT & DI CERA 2012; CHAKRABORTY & DI CERA, 2017), mas, para ambos os isômeros de zoxamida, a seleção conformacional parece ser o evento principal. A semelhança das conformações do sítio na presença e ausência do ligante (Figs. 11B a 11H) e a não sobreposição das populações conformacionais

destaca a prevalência de seleção conformacional. A prevalência de seleção conformacional justifica, em parte, o impacto das substituições estabilizadoras e desestabilizadoras quanto ao desenvolvimento de resistência, pois em ambos os casos, a alteração na flexibilidade do sítio terão impacto na interação proteína-ligante.

Dado que R-ZOX é mais eficiente do que S-ZOX no controle de fitopatógenos (PAN et al., 2020), a menor eficiência do isômero S-ZOX pode estar relacionada à maior estabilidade no sítio, dificultando a ligação covalente, devido a orientação do cloro em relação a CYS239 (Figs. 16D a 16F). Este evento, no entanto, deve ocorrer antes da S-ZOX adquirir a ligação a ILE236, pois assim como para R-ZOX (Fig. 18) esta interação favoreceu a proximidade do inibidor a CYS239, o que pode ser fundamental para a ocorrência da ligação covalente. Por outro lado, pode ser hipotetizado que a ligação covalente, como proposta por Velasco-Saavedra et al. (2023), por aumentar a flexibilidade de S-ZOX no sítio, terá como produto penalidade na inibição, enquanto que a maior estabilidade de R-ZOX, pós ligação covalente, justificaria a sua maior eficácia (PAN et al., 2020). Neste caso, substituições pontuais na posição CYS239 poderiam estar relacionadas a maior eficiência de S-ZOX em relação a R-ZOX.

Considerando a resistência causada por substituições pontuais, a simulação de dinâmica molecular indicou que interações do tipo ligação de hidrogênio podem ocorrer com grande frequência entre inibidores e os resíduos de ASN247, ILE236 e o ocupante da posição 239. Dado que a resistência à zoxamida não é de natureza qualitativa, os resíduos ocupantes das posições 236, 239 e 247 na β -tubulina possuem grande relevância para a ação inibitória. Esta hipótese é fundamentada pela ocorrência das interações em todos os sistemas simulados e as respectivas frequências. Em todos os casos avaliados, interações inibidor-sítio e a orientação do inibidor no sítio foram alteradas em comparação ao tipo selvagem. As substituições CYS239SER/THR/GLY/ALA, por exemplo, reduzem em parte as interações com ASN247 e ILE236, mas ao mesmo tempo os isômeros permanecem no sítio de ligação. Este fato, associado à ausência de ligação covalente à zoxamida em 239, pode justificar aumento da dose do oomicida para atingir a mesma eficiência de controle, como observado em *P. sojae* (CAI et al, 2016).

Além disso, é interessante observar que independente da ocorrência de ligação covalente, ao longo dos 500ns da simulação de dinâmica molecular, não foi

observada a expulsão dos inibidores do sítio de ligação. Isto, em parte, é um indício de que o sítio reduz a entropia conformacional do ligante, o que é suportado pela diminuição no número total de conformações entre ligante livre e no sítio de interação. A diminuição da entropia, pela maximização de interações proteína-ligante, é justificada devido à ligação de hidrogênio proteína-oomicida, pelos contatos hidrofóbicos, pelas interações de hidrogênio entre proteína-água-inibidor e por possíveis interações de halogênio entre os cloros da zoxamida e os resíduos da β -tubulina (SHINADA et al, 2019). Apesar do campo de força utilizado nas simulações não representar efeito de polarização, e considerar uma distribuição isotrópica das cargas dos átomos (WANG et al., 2004), a proximidade entre os grupos doador e aceptor de ligação de halogênio (Figs. 19 e 20) reforçam esta hipótese (SHIRIMULLA et al, 2013).

Este trabalho trouxe uma maior clareza sobre a interação da zoxamida no alvo molecular antes da ligação covalente quando comparado com estudo envolvendo *B. cinerea*-zoxamida em 100 ns de simulação (DU et al, 2019). A adição dos isômeros da zoxamida no sítio proposto por Velasco-Saavedra et al.(2023), o maior tempo de equilibração (1 ns), a maior fase de produção (500 ns) o maior número de frames avaliados e o estudo individual de cada isômero justificam o maior número de interações caracterizadas aqui.

Dada a aparente ausência de impedimento estrutural proteico para a ocorrência das substituições que favorecem resistência à zoxamida em *P. infestans* e a ocorrência de CYS239SER em *P. sojae* (CAI et al, 2016) que possui β -tubulina com elevada similaridade, atenção deve ser dada para o correto uso de zoxamida e no monitoramento de resistência em campo. Tal cuidado tem o intuito de preservar a vida útil da molécula, pois apesar da proposição de baixo risco de rápido desenvolvimento de resistência de *P. infestans* a zoxamida em campo (YOUNG et al, 2001) o risco não é desprezível. Assim, o uso criterioso da zoxamida, aliado a estratégias de manejo integrado de doenças, é fundamental para preservar a vida útil desse oomicida e mitigar a emergência de resistência.

6. Conclusão

O estudo *in silico* da diversidade teórica proteica de uma proteína alvo de fungicidas e oomicidas, associada à descrição dos resíduos de aminoácido importantes para a interação, é ferramenta útil para entender a resistência enquanto o risco e os impactos a nível atômico. Neste trabalho sugere-se que R-zoxamida e S-zoxamida interagem principalmente por seleção conformacional com o sítio de ligação na β -tubulina. Também neste trabalho o estudo de diversidade teórica, por meio de saturação de substituição, permitiu compreender o impacto da troca de resíduos na estabilidade do sítio e na propensão da ocorrência de resistência. O maior tempo de simulação na fase de produção, e o estudo individual de cada isômero do inibidor, permitiu caracterizar os resíduos ocupantes das posições 236, 239 e 247 na β -tubulina como de maior relevância para a ação inibitória, sendo os principais parceiros de ligação de hidrogênio com (R,S)-zoxamida. A diversidade de resíduos que fazem interação hidrofóbica também foi visualizada, e estes poderão constituir um grupo para o estudo futuro da caracterização da importância destas interações para a sensibilidade à zoxamida. Além disso, infere-se ser possível a ocorrência de ligação de halogênio entre proteína e (R,S)-zoxamida. No entanto, um estudo futuro utilizando um campo de força polarizado será útil para confirmar esta hipótese. O uso da modelagem molecular pode superar a dificuldade de fenotipar a diversidade teórica de *P. infestans* e predizer o risco de resistência à zoxamida.

7. Referências

ABRAHAM, M.; ALEKSEENKO, A.; BERGH, C.; BLAU, C.; BRIAND, E.; DOIJADE, M.; FLEISCHMANN, S.; GAPSYS, V.; GARG, G.; GORELOV, S.; GOUAILLARDET, G.; GRAY, A.; IRRGANG, M. E.; JALALYPOUR, F.; JORDAN, J.; JUNGHANS, C.; KANDURI, P.; KELLER, S.; KUTZNER, C.; LEMKUL, J. A.; LUNDBORG, M.; MERZ, P.; MILETIC, V.; MOROZOV, D.; PÁLL, S.; SCHULZ, R.; SHIRTS, M.; SHVETSOV, A.; SOPRONI, B.; VAN DER SPOEL, D.; TURNER, P.; UPHOFF, C.; VILLA, A.; WINGBERMÜHLE, S.; ZHMUROV, A.; BAUER, P.; HESS, B.; LINDAHL, E. GROMACS 2023.3 Manual. **Zenodo**, n. na. p. 1-864, 2023.

ABRAHAM, M. J.; MURTOLO, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J. C.; HESS, B.; LINDAHL, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1-2 , n. na , p. 19-25, 2015.

ABRAHAM, A.; NARAYANAN, SP.; PHILIP, S.; NAIR, DG. CHANDRASEKHARAN, A.; KOCHUPURACKAL, J. In silico characterization of a novel β -1,3-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*--a bacterial endophyte of *Hevea brasiliensis* antagonistic to *Phytophthora meadii*. **Journal of Molecular Modelling**, v. 19, n. 3, p. 999-1007, 2013.

ABULET, I. K.; HANSEN, J. G. Characterization of the level and type of resistance of potato varieties to late blight (*Phytophthora infestans*). **Phytopatology**, v. 112, n. 9, p. 1917-1927, 2022.

ABULEY, I. K.; LYNNOT, J. S.; HANSEN J. G.; COOKE, D. E. L.; LEES, A. K. The EU43 genotype of *Phytophthora infestans* displays resistance to mandipropamid. **Plant Pathology**, v. na, n. na, p. 1-9, 2023.

ADNAN, M.; HAMADA, M. S.; LI, G. Q.; LOU, C. X. Detection and molecular characterization of resistance to the dicarboxamide and benzamide fungicides in *Botrytis cinerea* from tomato in Hubei province, China. **Plant Disease**, v. 102, n. 7, p. 1299-1306, 2018.

AYYAMPERUMAL, S.; JADE, D.; TALLAPANENI, V.; MOHAN, S.; BARGE, S.; JOGHEE, N. M.; CHANDRASEKAR, M. J. N. Structural and functional analysis of chitinase-IV of *Brassica juncea*: molecular modeling and dynamics simulation study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 4, p. 1830-1842, 2022.

BAHADUR, R. P.; BASAK, J. Molecular modeling of protein-protein interaction to decipher the structural mechanism of nonhost resistance in rice. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 32, n. 4, p. 669-681, 2014.

BERMAN, H. M.; VALLAT, B.; LAWSON, C. L. The data universe of structural biology. **International Union of Crystallography Journal**, v. 7, n. 4, p. 630–638, 2020.

BLAABJERG, L. M.; KASSEM, M. M.; GOOD, L. L.; JONSSON, N.; CAGIADA, M.; JOHANSSON, K. E.; BOOMSMA, W.; STEIN, A. LINDORFF-LARSEN, K. Rapid protein stability prediction using deep learning representations. **eLIFE**, v. 12, n. na, p. 1-19, 2023.

BRESSO, E.; TOGAWA, R.; HAMMOND-KOSACK, K.; URBAN, M.; MAIGRET, B.; MARTINS, N. F. GPCRs from *fusarium graminearum* detection, modeling and virtual screening - the search for new routes to control head blight disease. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 463, p. 1-14, 2016.

CAI, M.; LIN, D.; CHEN, L. BI, Y.; XIAO, L.; LIU, X. M233I Mutation in the β -tubulin of *Botrytis cinerea* confers resistance to zoxamide. **Scientific Reports**, v. 5, n. 16881, p. 1-13, 2015.

CAI, M.; MIAO, J.; SONG, X.; LIN, D.; BI, Y.; CHEN, L.; LIU, X.; TYLER, B. M. C239S Mutation in the β -tubulin of *Phytophthora sojae* confers resistance to zoxamide. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 762, p. 1-10, 2016.

CAO, Z. W.; HAN, L. Y.; ZHENG, C. J.; JI, Z. L.; CHEN, X.; LIN, H. H.; CHEN, Y. Z. Computer prediction of drug resistance mutations in proteins. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 7, p. 521–529, 2005.

CHAKRABORTY, P.; DI CERA, E. Induced fit is a special case of conformational selection. *Biochemistry*, v. 56, n. 22, p. 2853-2859, 2017.

CROWLEY, P. J.; BERRY, E. A.; CROMARTIE, T.; DALDAL, F. GODFREY, C. R.; LEE, D. W.; PHILLIPS, J. E.; TAYLOR, A.; VINER, R.; The role of molecular modeling in the design of analogues of the fungicidal natural products crocacin A and D. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 24, p. 10345-10355, 2008.

CASA-COILA, V. H.; LEHNER, M. S.; HORA JÚNIOR, B. T.; REIS, A.; NAZARENO, N. R. X.; MIZUBUTI, E. S. G.; GOMES, C. B. First report of *Phytophthora infestans* self-fertile genotypes in southern Brazil. *Plant Disease*, v. 101, n. 9, p. na, 2017.

CASE, D. A.; AKTULGA, H. M.; BELFON, K.; CERUTTI, D. S.; CISNEROS, G. A.; CRUZEIRO, V. W. D.; FOROUZESH, N.; GIESE, T. J.; GÖTZ, A. W.; GOHLKE, H.; IZADI, S.; KASAVAJHALA, K.; KAYMAK, M. C.; KING, E.; KURTZMAN, T.; LEE, T.; LI, P.; LIU, J.; LUCHKO, T.; LUO, R.; MANATHUNGA, M.; MACHADO, M. R.; NGUYEN, H. M.; O'HEARN, K. A.; ONUFRIEV, A. V.; PAN, F.; PANTANO, S.; QI, R.; RAHNAMEH, A.; RISHEH, A.; SCHOTT-VERDUGO, S.; SHAJAN, A.; SWAILS, J.; WANG, J.; WEI, H.; WU, X.; WU, Y.; ZHANG, S.; ZHAO, S.; ZHU, Q.; CHEATHAM III, T. E.; ROE, D. R.; ROITBERG, A.; SIMMERLING, C.; YORK, D. M.; NAGAN, M. C.; MERZ Jr, K. M. AmberTools. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 63, n. 20, p. 6183-6191, 2023.

CATEN, C. E.; DAY, A. W. Diploidy in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, v. 15, n. na, p. 295-318, 1977.

COOKE, D. E. L.; LEES, A. K. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology*, v. 53, n. 6, p. 692-704, 2004.

CURRAN, P. R.; RADOUX, C. J.; SMILOVA, M. D.; SYKES, R. A.; HIGUERUELO, A. P.; BRADLEY, A. R.; MARSDEN, B. D.; SPRING, D. R.; BLUNDELL, T. L.; LEACH, A. R.; PITT, W. R.; COLE, J. C. Hotspots API: A Python package for the detection of small molecule binding hotspots and application to structure-based drug design. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 60, n. 4, p. 1911-1916, 2020.

DELGADO, J.; RADUSKY, L. G.; CIANFERONI, D.; SERRANO, L. FoldX 5.0: Working with RNA, small molecules and a new graphical interface. *Bioinformatics*, v. 35, n. 20, p. 4168–4169, 2019.

DOWNING, K. H.; NOGALES, E. Tubulin and microtubule structure. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 10, n. 1, p. 16-22, 1998.

DU, S.; ZHANG, K.; YAO, X.; DU, J. Investigation on the fungicide resistance mechanism against *Botrytis cinerea* β -tubulin inhibitor zoxamide by computational study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 38, n. 14, p. 4304–4312, 2019.

EBERHARDT, J.; SANTOS-MARTINS, D.; TILLACK, A. F.; FORLI, S. AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and Python bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 61, n. 8, p. 3891-3898, 2021.

ELOKELY, M. K.; DOERKSEN, J. R. Docking challenge: Protein sampling and molecular docking performance. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, n. 8, p. 1934-1945, 2013.

FEDOROV, V. A.; OREKHOV, P. S.; KHOLINA, E. G.; ZHMUROV, A. A.; ATAULLAKHANOV, F. I.; KOVALENKO, I. B.; GUNDIMCHUK, N. B. Mechanical properties of tubulin intra and inter dimer interface and their implications for microtubule dynamic instability, *Computational Biology*, v. 15, n. 8, p. 1-25, 2019.

FEI, F.; LI, X. B.; YANG, Y. Y.; ZHANG, J. Y.; ZHU, Y. X.; YIN, W. X.; LI, G. Q., LUO, C. X. Benzimidazole-resistant isolates with E198A/V/K mutations in the β -tubulin gene possess different fitness and competitive ability in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, v. 112, n. 11, p. 2321-2328, 2022.

FREY, K. M.; GEORGIEV, I.; DONALD, B. R.; ANDERSON, A. C. Predicting resistance mutations using protein design algorithms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 31, p. 13707–13712, 2010.

FIORINI, C. V. A.; SILVA, D. J. H.; SILVA F. F.; MIZUBUTI, E. S. G.; ALVES, D. P.; SÁ CARDOSO, T. Clustering of progress curves of late blight for tomato genotypes from

interspecific crosses. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 45, n. 10, p. 1095-1101, 2010.

FÖRSTER, H.; COFFEY, M. D. Mating behavior of *Phytophthora parasitica*: Evidence for sexual recombination in oospores using DNA restriction fragment length polymorphisms as genetic markers. *Experimental Mycology*, v. 14, n. 4, p. 351-359, 1990.

FÖRSTER, H.; OUDEMANS, P.; COFFEY, M. D. Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. *Experimental Mycology*, v. 14, n. 1, p. 18-31, 1990.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T. HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY Jr, J. A.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KEITH, T.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRAMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. Gaussian 09, Revision D.01, **Gaussian, Inc.**, Wallingford CT, 2013.

FRY, W. E. *Phytophthora infestans*: New tools (and old ones) lead to new understanding and precision management. *Annual Review of Phytopathology*, v. 54, p. 529–547, 2016.

FRY, W. E.; GOODWIN, S. B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Disease*, v. 81, n. 12, p. 1339-1472, 1997.

GADADHAR, S.; BODAKUNTLA, S.; NATARAJAN, K.; JANKE, C. The tubulin code at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 130, n. 8, p. 1347-1353, 2017.

GE, Y.; WU, J.; XIA, Y.; YANG, M.; XIAO, J.; YU, J. Molecular dynamics simulation of the complex PBP-2x with drug cefuroxime to explore the drug resistance mechanism of *Streptococcus suis* R61. *PLoS One*, v. 7, n. 4, p. 1-10, 2012.

GOVERS, F.; Misclassification of pest as “fungus” puts vital research on wrong track. *Nature*, v. 411, n. na, p. 633, 2001.

GRÜNWARD, N. J.; FLIER, W. G. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annual Review of Phytopathology*, v. 43, n. na, p. 171–190, 2005.

GRÜNWARD, N. J.; STURBAUM, A. K.; MONTES, G. R.; SERRANO, E. G.; LOZOYA-SALDAÑA, H.; FRY, W. E. Selection for fungicide resistance within a growing season in field populations of *Phytophthora infestans* at the center of origin. *Ecology and Epidemiology*, v. 96, n. 12, p. 1397-1403, 2006.

HAAS, B. J.; KAMOUN, S.; ZODY, M. C.; JIANG, R. H. Y.; HANDSAKER, R. E.; CANO, L. M.; GRABHERR, M.; KODIRA, C. D.; RAFFAELE, S.; TORTO-ALALIBO, T.; BOZKURT, T. O.; AH-FONG, A. M. V.; ALVARADO, L.; ANDERSON, V. L.; ARMSTRONG, M. R.; AVROVA, A.; BAXTER, L.; BEYNON, J.; BOEVINK, P. C.; BOLLMANN, S. R.; BOS, J. I. B.; BULONE, V.; CAI, G.; CAKIR, C.; CARRINGTON, J. C.; CHAWNER, M.; CONTI, L.; COSTANZO, S.; EWAN, R.; FAHLGREN, N.; FISCHBACH, M. A.; FUGELSTAD, J.; GILROY, E. M.; GNERRE, S.; GREEN, P. J.; GRENVILLE-BRIGGS, L. J.; GRIFFITH, J.; GRÜNWARD, N. J.; HORN, K.; HORNER, N. R.; HU, C.; HUITEMA, E.; JEONG, D.; JONES, A. M. E.; JONES, J. D. G.; JONES, R. W.; KARLSSON, E. K.; KUNJETI, S. G.; LAMOUR, K.; LIU, Z.; MA, L.; MACLEAN, D.; CHIBUCOS, M. C.; MCDONALD, H.; MCWALTERS, J.; MEIJER, H. J. G.; MORGAN, W.; MORRIS, P. F.; MUNRO, C. A.; O'NEILL, K.; OSPINA-GIRALDO, M.; PINZÓN, A.; PRITCHARD, L.; RAMSAHOYE, B.; REN, Q.; RESTREPO, S.; ROY, S.; SADANANDOM, A.; SAVIDOR, A.; SCHORNACK, S.; SCHWARTZ, D. C.; SCHUMANN, U. D.; SCHWESSINGER, B.; SEYER, L.; SHARPE, T.; SILVAR, C.; SONG, J.; STUDHOLME, D. J.; SYKES, S.; THINES, M.; VONDERVOORT, P. J. I.; PHUNTUMART, V.; WAWRA, S.; WEIDE, R.; WIN, J.; YOUNG, C.; ZHOU, S.; FRY, W.; MEYERS, B. C.; WEST, P.; RISTAINO, J.;

GOVERS, F.; BIRCH, P. R. J.; WHISSON, S. C.; JUDELSON, H. S.; NUSBAUM, C. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. **Nature**, v. 461, n. 7262, p. 393–398, 2009.

HAMMOND, J. W.; CAI, D.; VERHEY, K. J. Tubulin modification and their cellular functions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 71-76, 2008.

HANSSON, T. OOSTENBRINK, C. van GUNSTEREN, W. Molecular dynamics simulations. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, n. 2, p. 190-196, 2002.

HAVERKORT, A. J.; BOONEKAMP, P. M.; HUTTEN R.; JACOBSEN, E.; LOTZ, L. A. P.; KESSEL, G. J. T.; VISSER, R. G. F.; VOSSEN, E. A. G. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. **Potato Research**, v. 51, n. na, p. 47–57, 2008.

HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance: Facing the challenge. **Plant Protection Science**, v. 51, n. 4, p. 170–176, 2015.

JONES, S.; THORNTON, J. M. Principles of protein-protein interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 1, p. 13–20, 1996.

JOSHI, JR.; KHAZANOV, N.; CHARKOWAKI, A. FAIGENBOIM, A.; SENDEROWITZ, H.; YEDIDIA, I. Interkingdom Signaling Interference: The effect of plant-derived small molecules on quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review in Phytopathology**, v. 59, n. na, p. 153-190, 2021.

KUNOVA, A. PALAZZOLO, L.; FORLANI, F.; CATINELLA, G.; MUSSO, L. CORTESI, P.; EBERINI, I. PINTO, A.; DALLAVALLE, S. Structural investigation and molecular modeling studies of strobilurin-based fungicides active against the rice blast pathogen *Pyricularia oryzae*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 1-16, 2021.

LAMBERTH, C. Latest research trends in agrochemical fungicides: Any learnings for pharmaceutical antifungals? **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 6, p. 895-903, 2022.

LEACH, A. R.; HANN, M. M. Molecular complexity and fragment-based drug discovery: Ten years on. ***Current Opinion in Chemical Biology***, v. 15, n. 4, p. 489–496, 2011.

LEE, Y.; CHO, K. S.; SEO, J. H.; SOHN, K. H.; & PROKCHORCHIK, M. Improved genome sequence and gene annotation resource for the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. ***Molecular Plant-Microbe Interactions***, v. 33, n. 8, p. 1025–1028, 2020.

LEI, R. HERNANDEZ-GARCIA, A. TAN, T. J. C. TEO, Q. W. WANG, Y. ZHANG, X. LUO, S. NAIR, S. K. PENG, J. WU, N. C. Mutational fitness landscape of human influenza H3N2 neuraminidase. ***Cell Reports***, v. 42, n. 1, p. 1-15, 2023.

LEMKUL, J. A. From proteins to perturbed Hamiltonians: A suite of tutorials for the GROMACS-2018 molecular simulation package [Article v1.0]. ***Living Journal of Computational Molecular Science***, v. 1, n. 1, p. 1-53, 2019.

LINDORFF-LARSEN, K.; PIANA, S.; PALMO, K.; MARAGAKIS, P.; KLEPEIS, J. L.; DROR, R. O.; SHAW, D. E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. ***Proteins***, v. 78, n. 8, p. 1950-1958, 2010.

LIU, M.; WANG, F.; HE, B.; HU, J.; DAI, Y.; CHEN, W.; YI, M.; ZHANG, H.; YE, Y.; CUI, Z.; ZHENG, X.; WANG, P.; XING, W.; ZHANG, Z. Targeting *Magnaporthe oryzae* effector MoErs1 and host papain-like protease OsRD21 interaction to combat rice blast. ***Nature Plants***, v. 10, n. 4, p. 618-632, 2024..

McDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. ***Annual Review of Phytopatology***, v. 40, n. na, p. 349-379, 2002.

MEI, X. YANG, M. DING, X. BI, Y. CHEN, L. DENG, W. DONG, Y. SU, Y. HE, X. ZHU, S. LIU, X. Proteomic analysis of zoxamide-induced changes in *Phytophthora cactorum*. ***Pesticide Biochemistry and Physiology***, v. 113, n. na, p. 31-39, 2014.

MODELLER, Program for comparative protein structure modelling by satisfaction of spatial restraints. (Disponível em: https://salilab.org/modeller/download_installation.html. Acesso em: 11/22).

MÖLLER, K.; DILGER, M.; HABERMEYER, J.; ZINKERNAGEL, V.; FLIER, W. G. HAUSLADEN, H. Population studies on *Phytophthora infestans* on potatoes and tomatoes in southern Germany. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, n. na, p. 659-672, 2009.

PAN, X.; WU, X.; LIU, N.; XU, J.; LIU, X.; WU, X.; FENG, Y.; LI, R.; DONG, F.; ZHENG, Y. A systematic evaluation of zoxamide at enantiomeric level. **Science of the Total Environment**, v. 733, n. na, p. 1-9, 2020.

PERACCHI, M.; MADDALENA, G. LECCHI, B. MASSI, F.; TOFFOLATTI, S. L. The role of selection pressure in shaping zoxamide resistance in *Plasmopara viticola* populations. **Pest Management Science**, v. 81, n. 9, p. 5360-5367, 2025.

PÔLETO, M. D.; GRISCI, B. I.; DORN, M.; VERLI, H. ConfID: an analytical method for conformational characterization of small molecules using molecular dynamics trajectories. **Bioinformatics**, v. 36, n. 11, p. 3576- 3577, 2020.

PYMOL BY SCHRÖDINGER (Disponível em : <https://pymol.org/2/>)

RADUSKY, L. G.; SERRANO, L. PyFoldX: enabling biomolecular analysis and engineering along structural ensembles. **Bioinformatics**, v. 38, n. 8, p. 2353–2355, 2022.

RUBIN, A.; GOTLIEB, D.; GISI, U.; COHEN, Y. Mutagenesis of *Phytophthora infestans* for resistance against carboxylic acid amide and phenylamide fungicides. **Plant Disease**, v. 92, n. 5, p. 675-683, 2008.

SARKAR, D.; MAJUMDER, S.; GIRI, K.; SABNAM, N. *In silico* characterization, molecular docking, and dynamic simulation of a novel fungal cell-death suppressing effector, MoRlpA as potential cathepsin B-like cysteine protease inhibitor during rice blast infection. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 18, p. 9039-9056, 2022.

SAVILLE, A.; GRAHAM, K.; GRÜNWARD, N. J.; MYERS, K.; FRY, W. E.; RISTAINO, J. B. Fungicide sensitivity of U.S. genotypes of *Phytophthora infestans* to six oomycete-targeted compounds. ***Plant Disease***, v. 99, n. 5, p. 659-666, 2015.

SCHYMKOWITZ, J.; BORG, J.; STRICHER, F.; NYS, R.; ROUSSEAU, F.; SERRANO, L. The FoldX web server: An online force field. ***Nucleic Acids Research***, v. 33, n. 2, p. 382–388, 2005.

SENIOR, A. W.; EVANS, R.; JUMPER, J.; KIRKPATRICK, J.; SIFRE, L.; GREEN, T.; QIN, C.; ŽÍDEK, A.; NELSON, A. W. R.; BRIDGLAND, A.; PENEDONES, H.; PETERSEN, S.; SIMONYAN, K.; CROSSAN, S.; KOHLI, P.; JONES, D. T.; SILVER, D.; KAVUKCOUGLU, K.; HASSABIS, D. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. ***Nature***, v. 577, n. 7792, p. 706–710, 2020.

SEONG, K.; KRASILEVA, K. V. Prediction of effector protein structures from fungal phytopathogens enables evolutionary analyses. ***Nature Microbiology***, v. 8, n. 1, p. 174-187, 2023.

SHATTOCK, R. C.; TOOLEY, P. W.; FRY, W. E. Genetics of *Phytophthora infestans*: Determination of recombination, segregation and selfing by isozymes analysis. ***Phytopathology***, v. 76, n. 4, p. 410-413, 1986.

SHI, N.; ZHENG, Q.; ZHANG, H. Molecular Dynamics Investigations of Binding Mechanism for Triazoles Inhibitors to CYP51. ***Frontiers in Molecular Bioscience***, v. 27, n. 7, p. 1-11, 2020.

SHINADA, N. K.; BREVERN, A. G.; SCHMIDTKE, P. Halogens in protein-ligand binding mechanism: A structural perspective. ***Journal of Medicinal Chemistry***, v. 62, n. 21, p. 9341-9356, 2019.

SIEROTZKI, H.; SCALLIET, G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. ***Phytopathology***, v. 103, n. 9, p. 880-887, 2013.

SIRIMULLA, S.; BAILEY, J. B.; VEGESNA, R.; NARAYAN, M. Halogen interactions in protein-ligand complexes: implications of halogen bonding for rational drug design. ***Journal of Chemical Information and Modeling***, v. 53, n. 11, p. 2781-2791, 2013.

SORA, V.; LASPIUR, A. O.; DEGN, K.; ARNAUDI, M.; UTICHI, M.; BELTRAME, L.; MENEZES, D.; ORLANDI, M.; STOLTZE, U. K.; RIGINA, O.; SACKETT, P. W.; WADT, K.; SCHMIEGELOW, K.; TIBERTI, M.; PAPALETTO, E. RosettaDDG prediction for high-throughput mutational scans: From stability to binding. **Protein Science**, v. 32, n. 1, p. 1-25, 2022.

THIEKER, D. F.; MAGUIRE, J. B.; KUDLACEK, S. T.; LEAVER-FAY, A.; LYSKOV, S.; KUHLMAN. Stabilizing proteins, simplified: A Rosetta-based webtool for predicting favorable mutations. **The Protein Society**, v. 31, n. 10, p. 1-9, 2022.

TIBERTI, M.; TERKELSEN, T.; DEGN, K.; BELTRAME, L.; CREMERS, T. C.; PIEDADE, I.; MARCO, M. D.; MAIANI, E.; PAPALETTO, E. MutateX: An automated pipeline for in silico saturation mutagenesis of protein structures and structural ensembles. **Briefings in Bioinformatics**, v. 23, n. 3, p. 1–16, 2022.

TOOLEY, P. W.; THERRIEN, C.D. Cytophotometric determination of the nuclear DNA content of 23 Mexican and 18 non-Mexican isolates of *Phytophthora infestans*. **Experimental Mycology**, v 11, n. 1, p. 19-26, 1987.

TYZACK, J. D.; FURNHAM, N.; SILLITOE, I.; ORENCO, C. M.; THORNTON, J. M. Understanding enzyme function evolution from a computational perspective. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 47, n. na, p. 131-139, 2017.

VELASCO-SAAVEDRA, M. A.; MAR-ANTONIO, E.; AGUAYO-ORTIZ, R. Molecular insights into the covalent binding of zoxamide to the β -tubulin of *Botrytis cinerea*. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 20, p. 6386-6395, 2023.

VERLI, H. *Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular*. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, n. 1, p. 148-171, 2014.

VERMA, R.; PRADHAN, D.; NAYEK, A.; SINGH, H.; JAIN, A. K.; KHAN, L. A. Target-based drug repurposing against *Candida albicans*-A computational modeling, docking, and molecular dynamic simulations study. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 123, n. 2, p. 289-305, 2022.

VÉRTESSY, B. G.; OROSZ, F. From "fluctuation fit" to "conformational selection": evolution, rediscovery, and integration of a concept. **Bioessays**, v. 33, n. 1, p. 30-34, 2011.

VOGT, A. D.; DI CERA, E. Conformational selection or induced fit? A critical appraisal of the kinetic mechanism. **Biochemistry**, v. 41, n. 30, p. 5894-5902, 2012.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering and Design Selection**, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.

WANG, J.; WOLF, R. M.; CALDWELL, J. W.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A. Development and testing General Amber Force Field, **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157-1174, 2004.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics 54, John Wiley & Sons**, v. na, n. na, p. na, 2016.

WEBSTER, J.; WEBER, R. Straminipila: Oomycota. In *Introduction to Fungi*, **Cambridge: Cambridge University Press**, n. 8, p. 75-126, 2007.

WOODHAM-SMITH, C. The Great Hunger, Reprint. edition. Harper and Row 1962.

WHITTAKER, S. L.; ASSINDER, S. J.; SHAW, D. S. Inheritance of mitochondrial DNA in *Phytophthora infestans*. **Mycological Research**, v. 98, n. 5, p. 569-575, 1993

XIA, D.; ESSER, L.; TANG, W. K.; ZHOU, F.; ZHOU, Y.; YU, L.; YU, C. A. Structural analysis of cytochrome bc1 complexes: Implications to the mechanism of function. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1827, n. 11-12, p. 1278-1294, 2013.

YIN, Y.; MIAO, J.; SHAO, W.; LIU, X.; ZHAO, Y.; MA, Z. Fungicide resistance: Progress in understanding mechanism, monitoring, and management. **Phytopathology review**, v. 113, n. 4, p. 707-718, 2023.

YOUNG, D. H.; SLAWECKI, R. A. Mode of action of zoxamide (RH-7281), a new oomycete fungicide. ***Pesticide Biochemistry and Physiology***, v. 69, n. 2, p. 100-111, 2001.

YOUNG, D. H.; SPIEWAK, S. L.; SLAWECKI, R. A. Laboratory studies to assess the risk of development of resistance to zoxamide. ***Pest Management Science***, v. 57, n. 11, p. 1081-1087, 2001.

ZALA, A. R.; RAJANI, D. P.; AHMAD, I.; PATEL, H.; KUMARI, P. Synthesis, characterization, molecular dynamic simulation, and biological assessment of cinnamates linked to imidazole/benzimidazole as a CYP51 inhibitor. ***Journal of Biomolecular Structure and Dynamics***, v. 41, n. 21, p. 11518-11534, 2023.

ZIOGAS, B. N.; MARKOGLOU, A. N.; THEODOSIOU, D. I.; ANAGNOSTOU, A.; BOUTOPOULO. A high multi-drug resistance to chemically unrelated oomycete fungicides in *Phytophthora infestans*. ***European Journal of Plant Pathology***, v. 115, n. na, p. 283-292, 2006.

ZHOU, Y.; CHEN, L.; HU, J.; DUAN, H.; LIN, D.; LIU, P.; MENG, Q.; LI, B.; SI, N.; LIU, C.; LIU, X. Resistance mechanisms and molecular docking studies of four novel QoI fungicides in *Peronophythora litchii*. ***Scientific Reports***, 5(October), p. 1–10, 2015.

APÊNDICE:

APÊNDICE A - ARQUIVOS DE PARÂMETROS DE DINÂMICA MOLECULAR.

Pós adição de íons:

```

title          = Minimization    ; Title of run
integrator     = steep           ; Algorithm (steep = steepest descent minimization)
emtol         = 1000.0
emstep        = 0.01
nsteps        = 50000
nstlist       = 1
cutoff-scheme = Verlet
ns_type       = grid
rlist         = 1.0
coulombtype   = cutoff
rcoulomb      = 1.0
rvdw          = 1.0
pbc           = xyz

```

Minimização de energia:

```

title          = Minimization    ; Title of run
integrator     = steep           ; Algorithm (steep = steepest descent minimization)
emtol         = 1000.0
emstep        = 0.01
nsteps        = 50000
nstlist       = 1
cutoff-scheme = Verlet
ns_type       = grid
rlist         = 1.0
coulombtype   = PME
rcoulomb      = 1.0
vdwtype       = cutoff
vdw-modifier  = Potential-shift

```

rvdw-switch = 1.0
rvdw = 1.0
pbc = xyz
DispCorr = no

Equilíbrio NVT:

define = -DPOSRES
integrator = md
nsteps = 500000
dt = 0.002
nstxout = 500
nstvout = 500
nstlog = 500
nstenergy = 500
constraint_algorithm = lincs
constraints = h-bonds
lincs-iter = 1
lincs-order = 4
continuation = no
cutoff-scheme = Verlet
ns_type = grid
nstlist = 20
rlist = 1.0
pbc = xyz
vdw-type = cutoff
vdw-modifier = Potential-shift
rvdw = 1.0
rvdw-switch = 1.0
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.0
pme-order = 4
fourierspacing = 0.125
tcoupl = v-rescale
tc-grps = Protein_GTP_GDP_ZOX Water_and_ions

tau-t = 0.1 0.1
ref-t = 300.00 300.00
gen-vel = yes
gen-temp = 300
gen-seed = -1
pcoupl = no

Equilíbrio NPT:

define = -DPOSRES
integrator = md
nsteps = 500000
dt = 0.002
nstxout-compressed = 500
nstlog = 500
nstenergy = 500
constraint_algorithm = lincs
constraints = h-bonds
lincs-iter = 1
lincs-order = 4
lincs-warnangle = 30
continuation = yes
cutoff-scheme = Verlet
ns-type = grid
nstlist = 20
pbc = xyz
vdw-type = cutoff
vdw-modifier = Potential-shift
rvdw = 1.0
rvdw-switch = 1.0
rlist = 1.0
DispCorr = EnerPres
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.0
pme-order = 4

```

fourierspacing    = 0.125
tcoupl            = V-rescale
tc-grps           = Protein_GTP_GDP_ZOX Water_and_ions
tau-t             = 0.1      0.1
ref-t             = 300.00   300.00
gen-vel           = no
pcoupl            = C-rescale
pcoupltype        = isotropic
tau_p            = 5.0
ref_p             = 1.0
compressibility   = 4.5e-5
refcoord_scaling  = com

```

Fase de produção de dinâmica molecular:

```

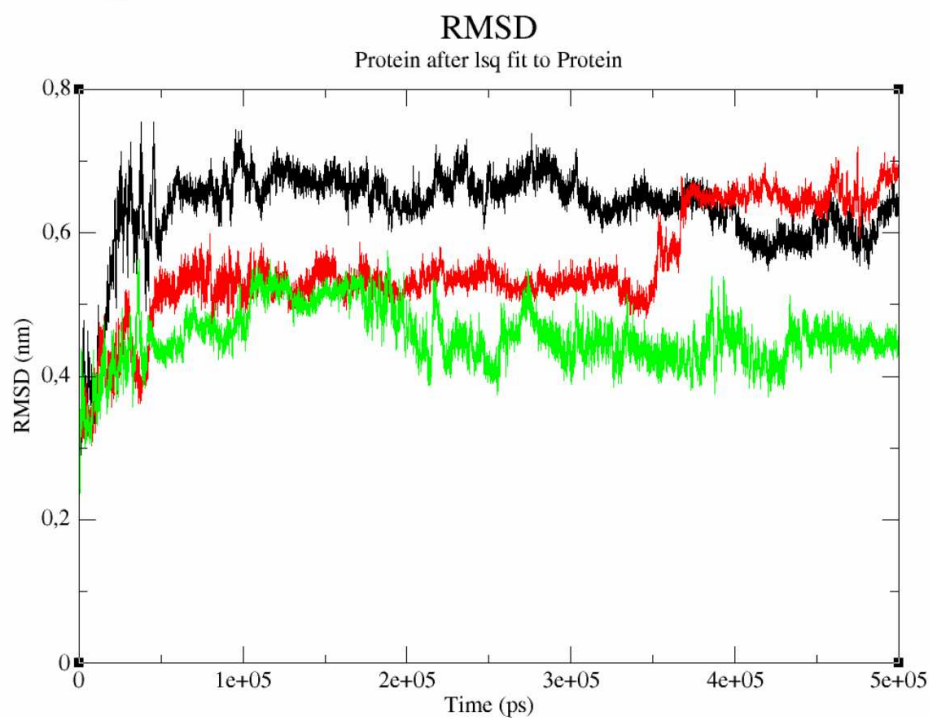
integrator        = md
nsteps           = 250000000
dt               = 0.002

```

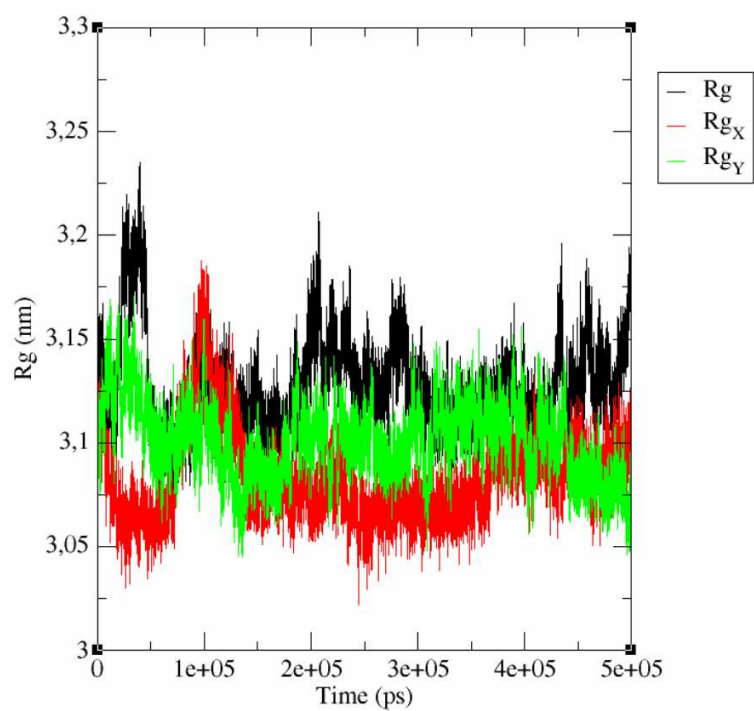
*Demais parâmetros da fase de produção podem ser adquiridos através do contato direto com o pesquisador pelo email: gabriel.alves2@ufv.br.

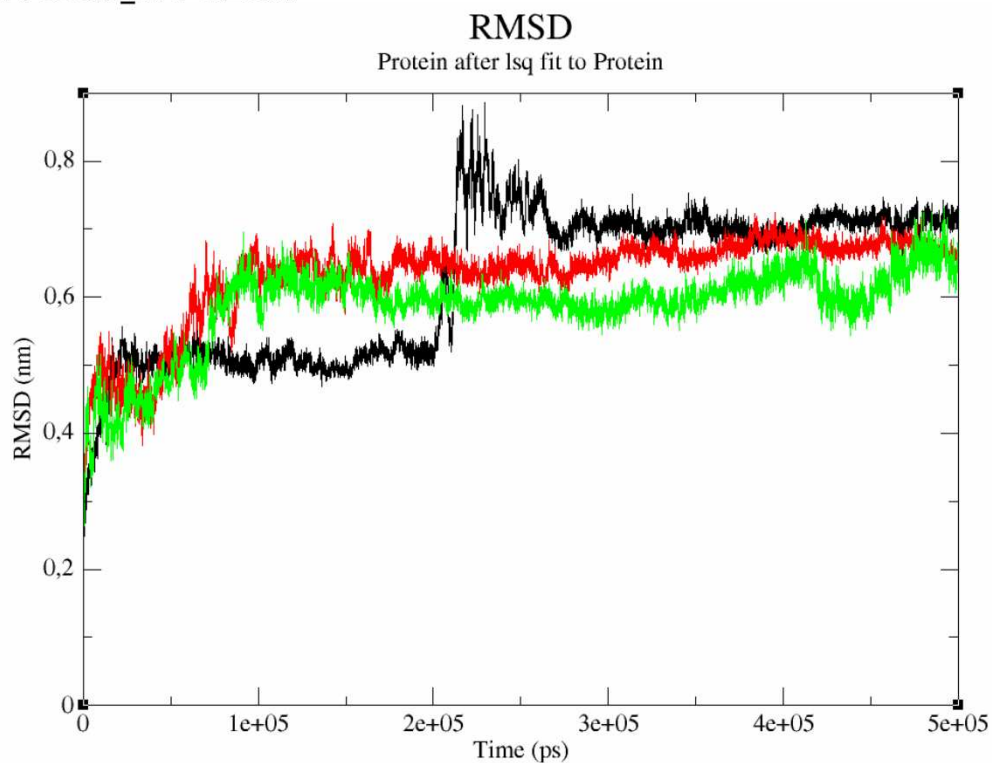
APÊNDICE B - RMSD E RAIOS DE GIRO.

As cores em cada gráfico representam as diferentes repetições da simulação. Simulações considerando o heterodímero original sem o inibidor (A-Btub_WT) e com os inibidores R-zoxamida (A-Btub_WT-RZOX) e S-zoxamida (A-Btub_WT-SZOX) são apresentados para ilustrar o comportamento de RMSD e raio de giro.

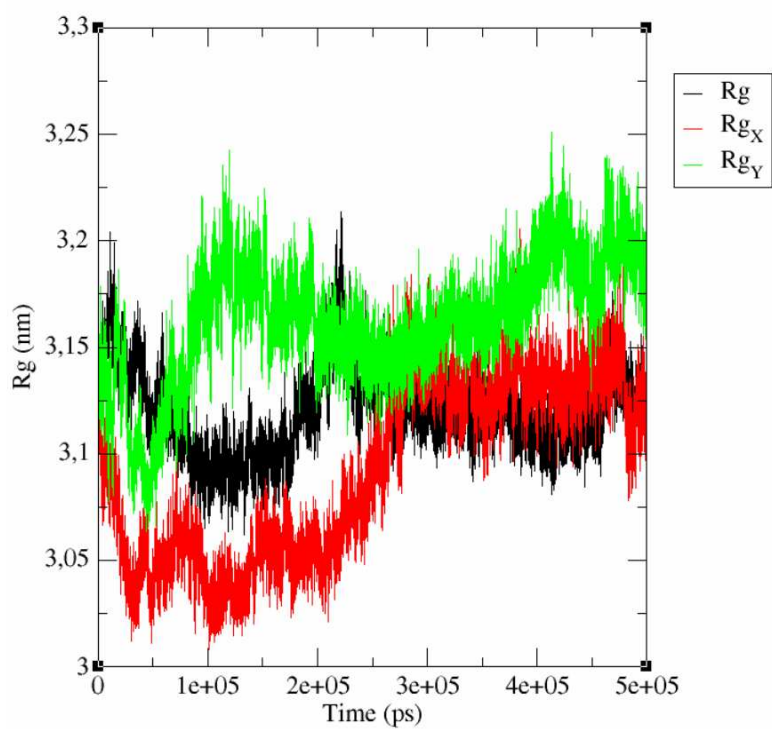
A-Btub_WT**A-Btub_WT**

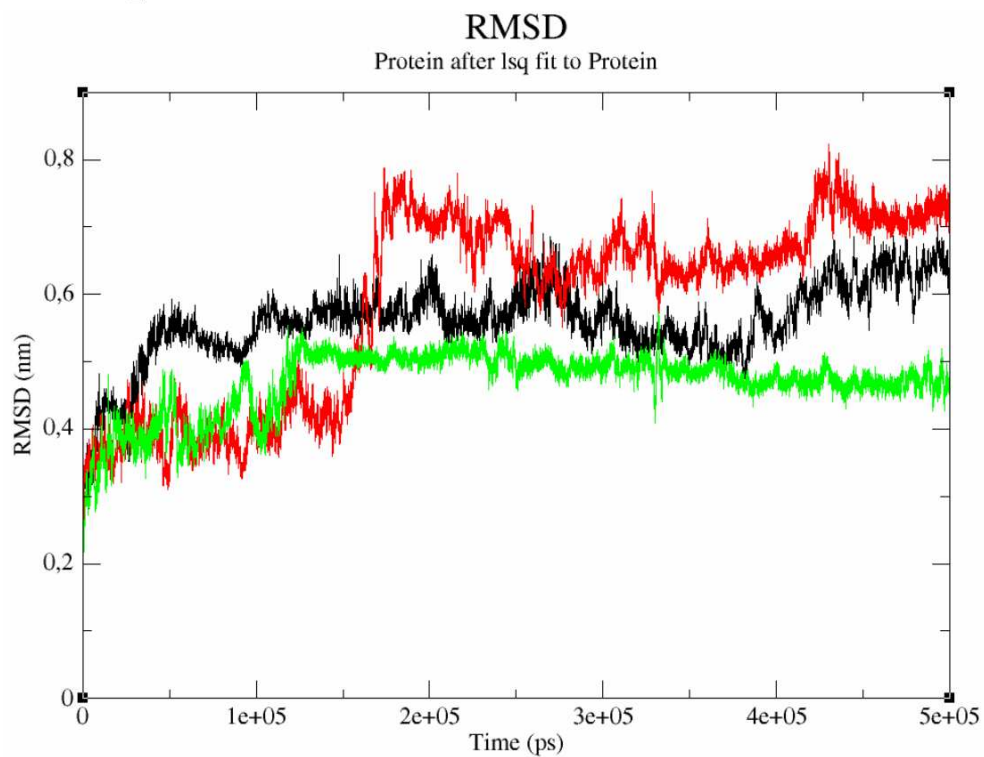
Radius of gyration (total and around axes)



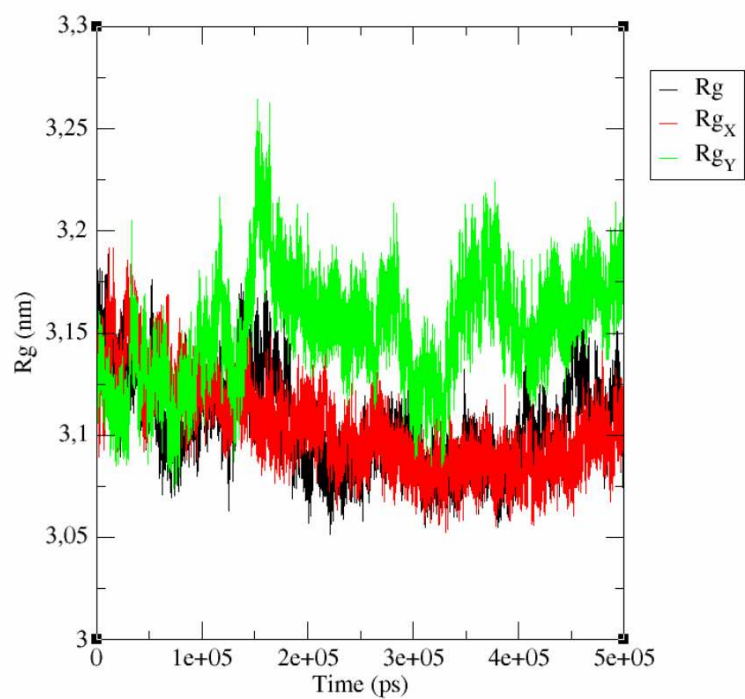
A-Btub_WT-RZOX**A-Btub_WT-RZOX**

Radius of gyration (total and around axes)



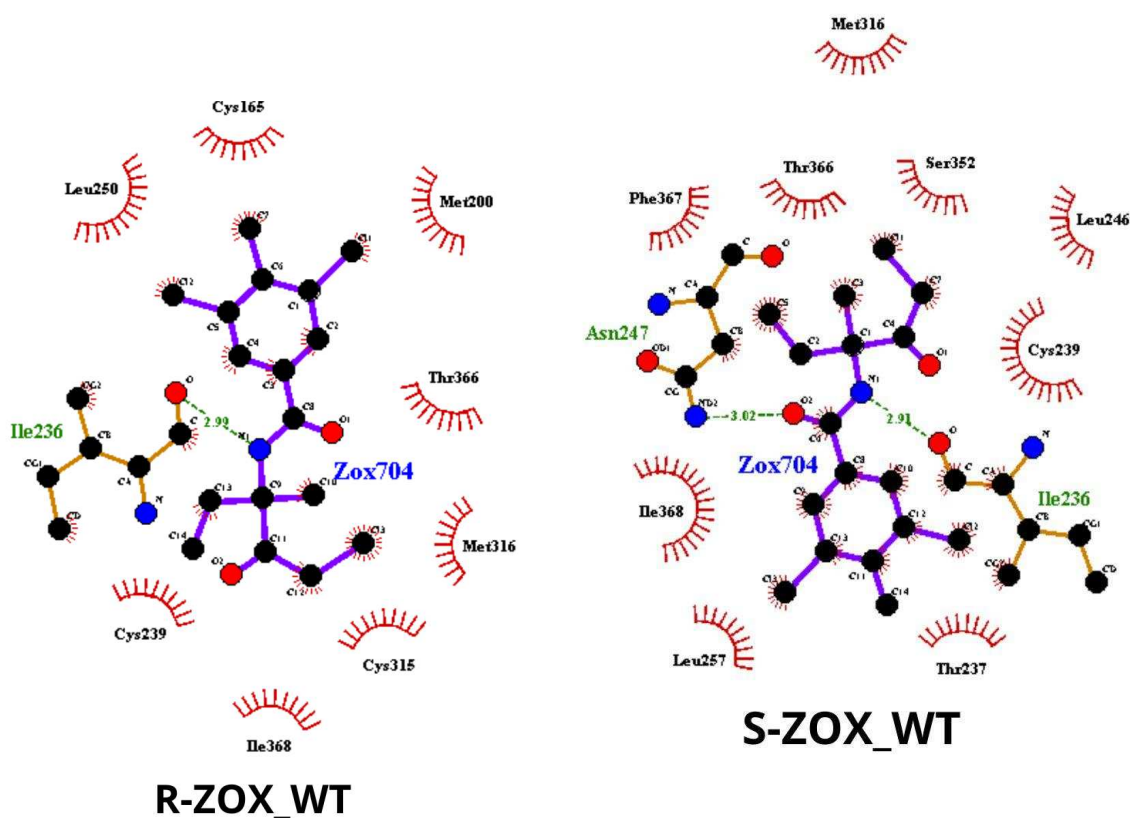
A-Btub_WT-SZOX**A-Btub_WT-SZOX**

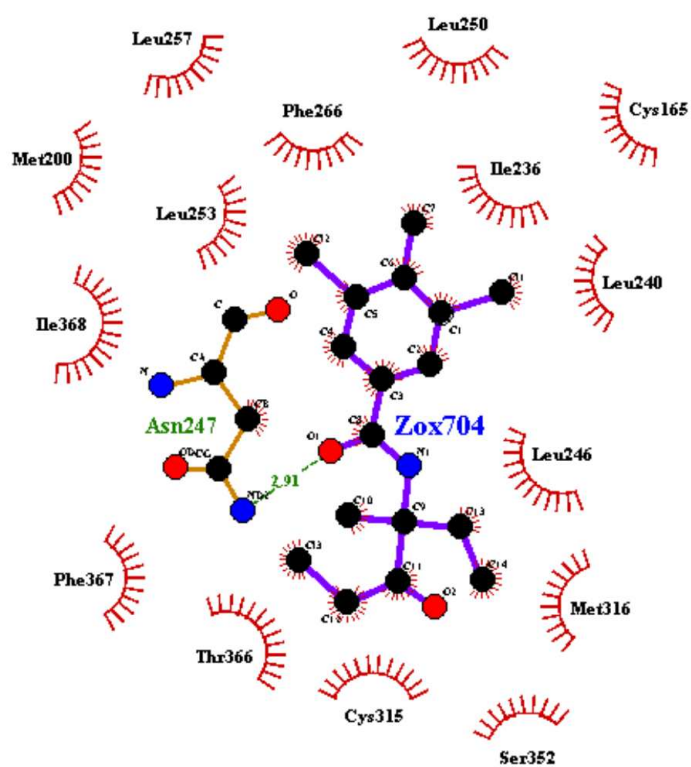
Radius of gyration (total and around axes)



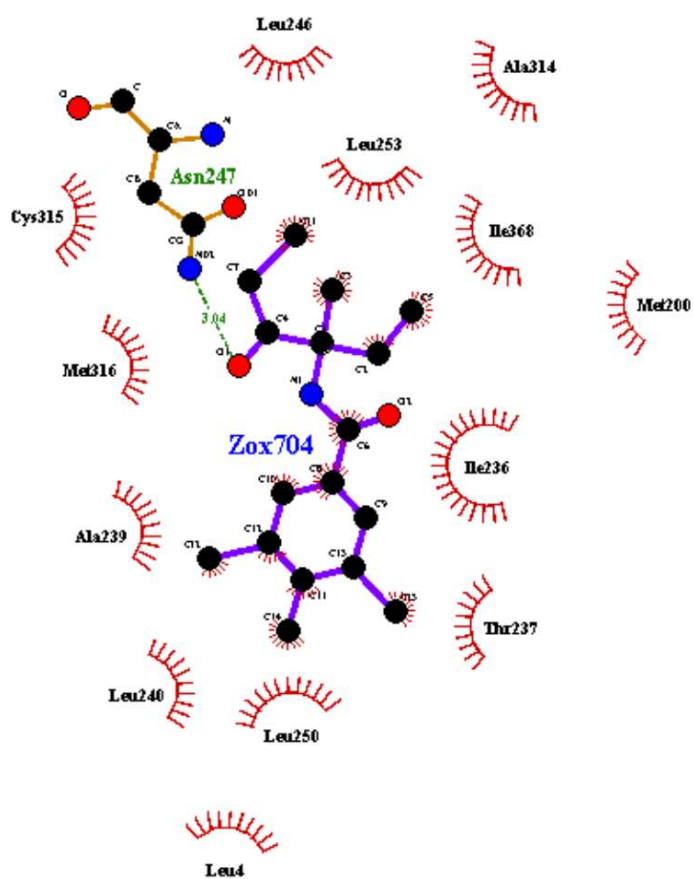
APÊNDICE C - INTERAÇÃO ENTRE ISÔMEROS DE ZOXAMIDA E O SÍTIO DE LIGAÇÃO

Interações de R-zoxamida e S-zoxamida com o sítio de ligação nas diferentes simulações. Destaque para ligação de hidrogênio (linha verde tracejada). Os demais resíduos representados pelo código de três letras possuem interação hidrofóbica com o inibidor.

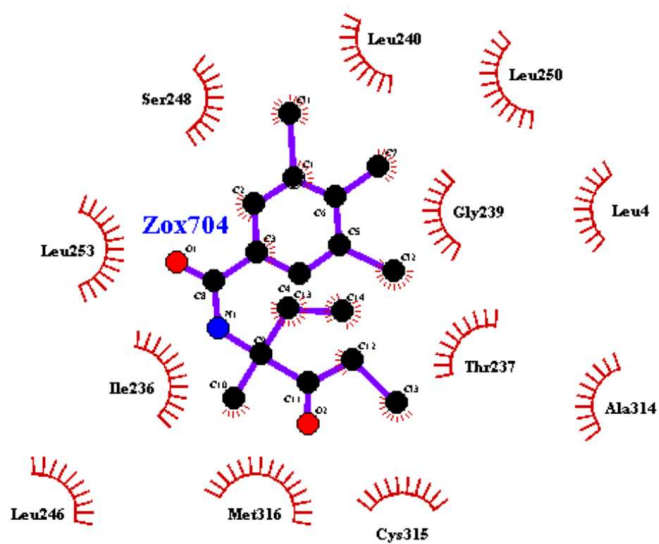




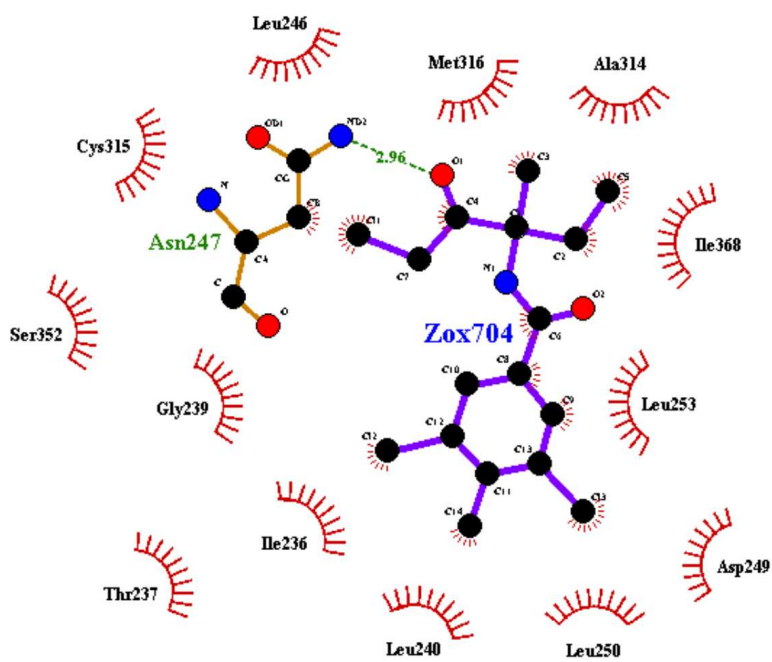
R-ZOX_C239A



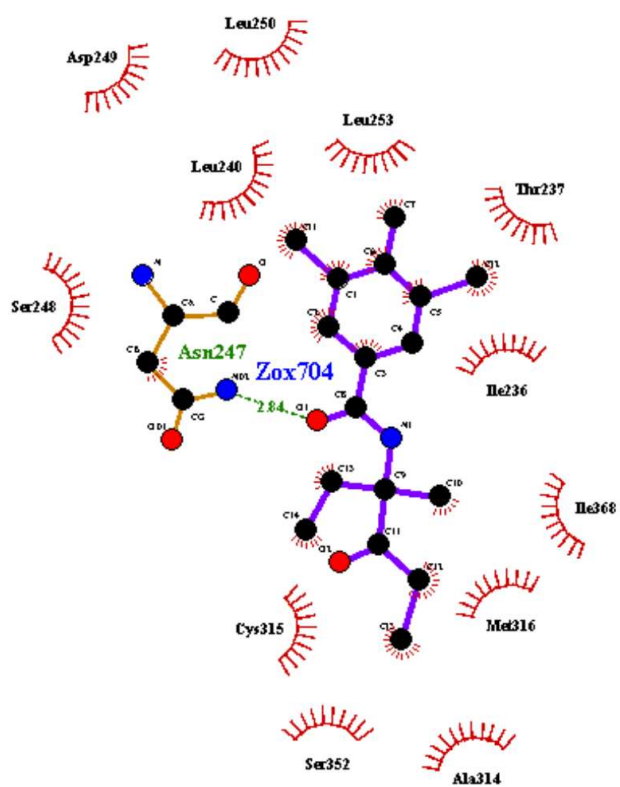
S-ZOX_C239A



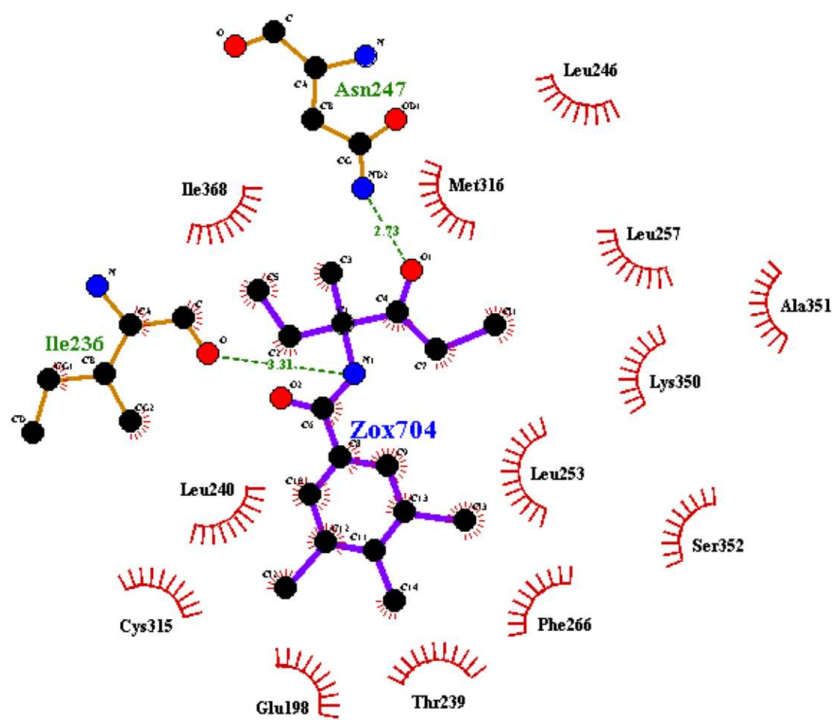
R-ZOX_C239G



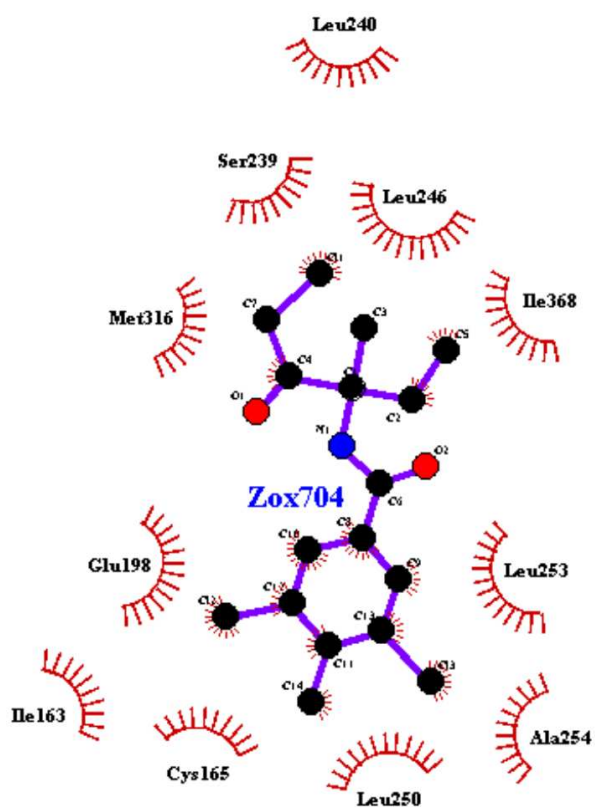
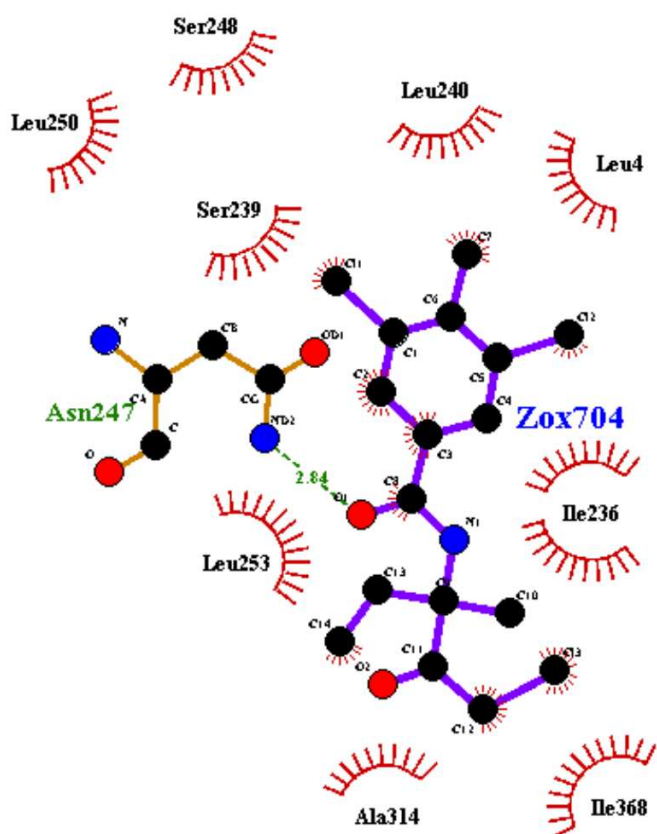
S-ZOX_C239G

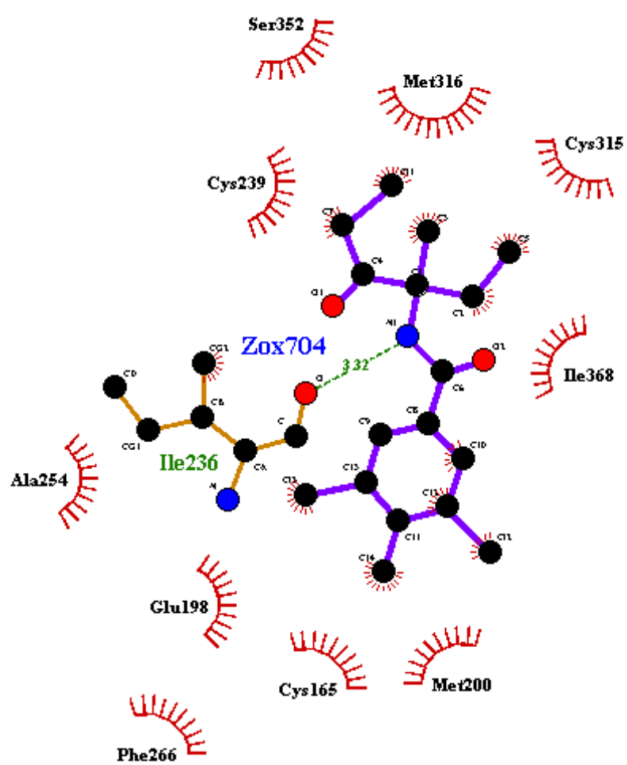


R-ZOX_C239T

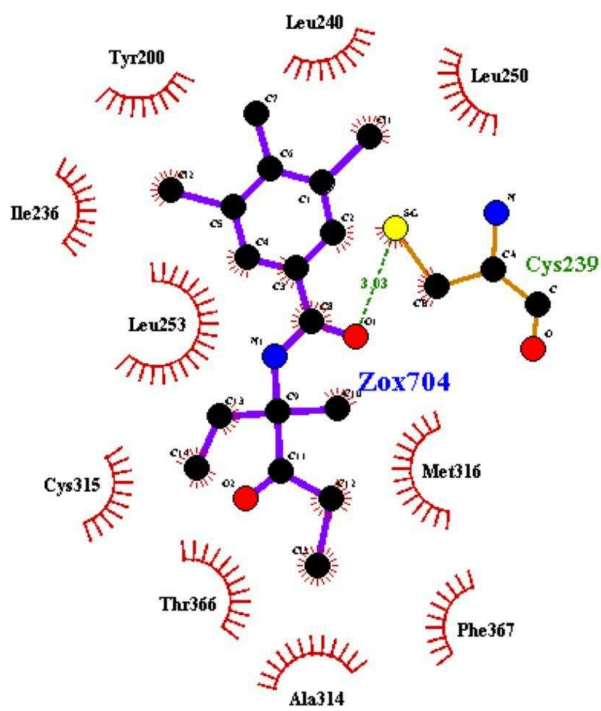


S-ZOX_C239T

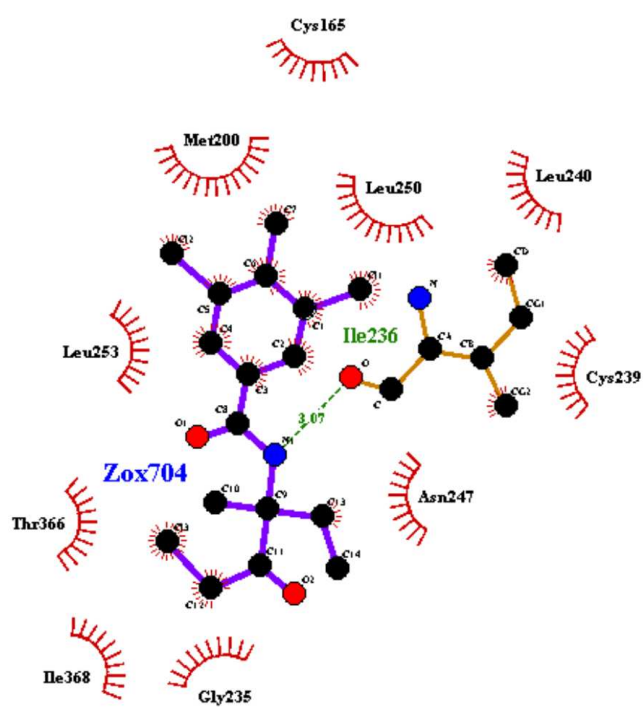
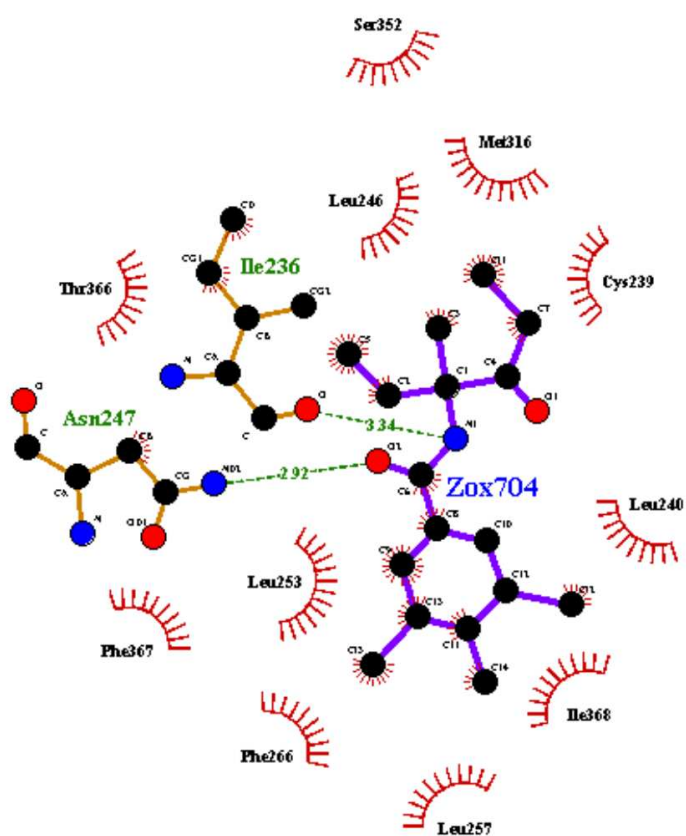


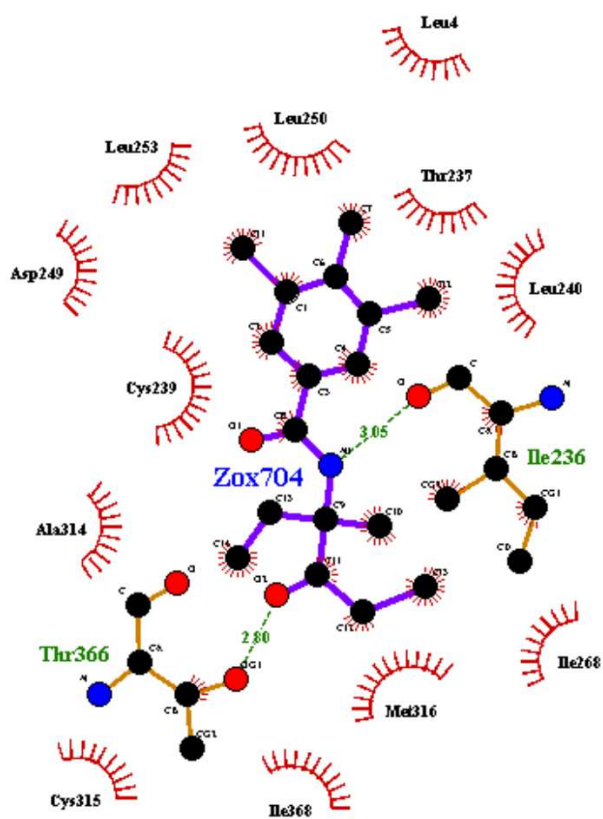


S-ZOX_N247A

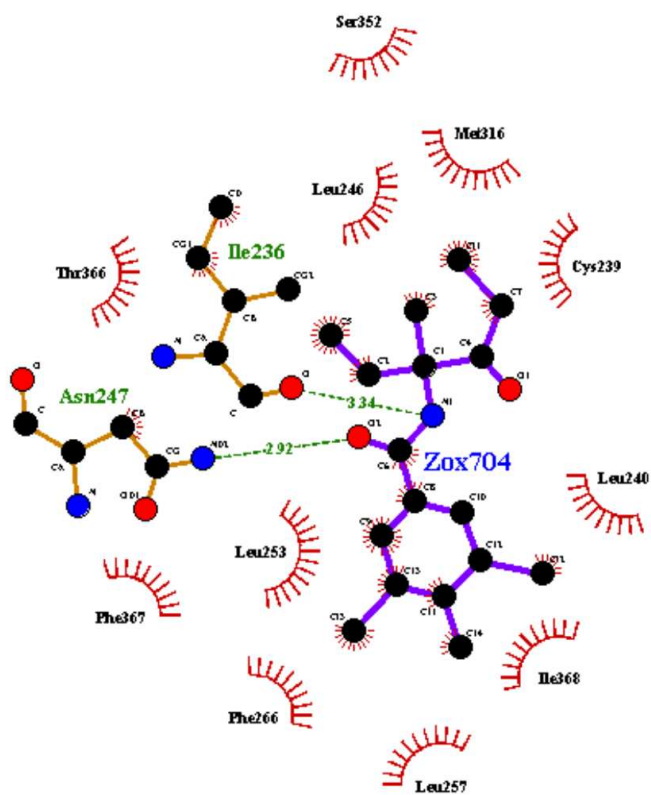


R-ZOX_M200Y

**R-ZOX_M233I****S-ZOX_M233I**



R-ZOX_M233A



S-ZOX_M233I