

ESTUDOS *IN SILICO* PARA A IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS INIBIDORES FRENTE AO CCR2 ASSOCIADO AO PROCESSO INFLAMATÓRIO CAUSADO PELO VÍRUS *CHIKUNGUNYA*

IN SILICO STUDIES FOR THE IDENTIFICATION OF POTENTIAL INHIBITORS AGAINST THE CCR2 ASSOCIATED WITH THE INFLAMMATORY PROCESS CAUSED BY CHIKUNGUNYA VIRUS

DOI: 10.16891/2317-434X.v13.e5.a2025.id2339

Recebido em: 24.09.2024 | Aceito em: 15.01.2025

Andressa Rios Cardoso Nunes^{a*}, Larissa Oliveira Dourado^a, Larissa de Mattos Oliveira^a, Manoelito Coelho dos Santos Junior^a

Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, Feira de Santana – BA, Brasil[®]
***E-mail: andressariosc@gmail.com**

RESUMO

A febre Chikungunya (CHIKF) é causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), transmitido por meio da picada da fêmea infectada do mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. A fase crônica dessa doença é marcada pela presença de dores articulares persistentes devido a expressão em níveis elevados da quimiocina CCL2 e seu receptor de quimiocina do tipo 2 (CCR2). A ligação do receptor com sua quimiocina medeia a quimiotaxia e induz à migração de células inflamatórias, o que contribui para o quadro inflamatório, por isso inibidores que bloqueiam a interação entre CCR2 e CCL2 têm esperado que se torne um novo mecanismo terapêutico para doenças relacionadas à inflamação. Os objetivos desse trabalho foram realizar uma triagem virtual hierárquica utilizando o banco de dados de produtos naturais do ZINC15. O modelo do CCR2 foi construído no servidor MODELLER e avaliado no servidor SWISSMODEL. Os modelos farmacofóricos foram construídos no módulo GALAHAD, utilizando inibidores extraídos do ChEMBL. Apenas 181 compostos se alinharam ao modelo farmacofórico. Utilizando o programa FRED, o composto foi selecionado por afinidade molecular com o CCR2. A dinâmica molecular foi conduzida para analisar o padrão de interações intermoleculares e a estabilidade do complexo sob condições que se aproximam do ambiente biológico. Os resultados obtidos nas abordagens *in silico* mostraram que o composto ZINC000225476190 apresenta um padrão interessante de interações intermoleculares, bem como boa estabilidade no complexo dinâmico, configurando uma molécula promissora.

Palavras-chave: Chikungunya; CCR2; Triagem virtual.

ABSTRACT

Chikungunya fever (CHIKF) is caused by the Chikungunya virus (CHIKV), transmitted through the bite of infected female *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. The chronic phase of this disease is marked by the presence of persistent joint pain due to the expression at high levels of the chemokine CCL2 and its chemokine receptor type 2 (CCR2). Binding of the receptor with its chemokine mediates chemotaxis and induces migration of inflammatory cells, which contributes to the inflammatory condition. Hence, inhibitors that block the interaction between CCR2 and CCL2 have been expected to become a new therapeutic mechanism for inflammation-related diseases. The objectives of this work were to conduct a hierarchical virtual screening using the ZINC15 natural product database. The CCR2 model was constructed in MODELLER server, and available in SWISSMODEL server. Pharmacophore models were constructed in GALAHAD module using inhibitors extracted to ChEMBL. Only 181 compounds for ZINC15 align to the pharmacophore model. Using FRED program the compound was ranked by molecular affinity with CCR2. Molecular dynamics was conducted in order to be analyzed for the pattern of intermolecular interactions and the stability of the complex under conditions that approximate the biological environment. The results obtained in the *in silico* approaches showed that the compound ZINC000225476190 presents an interesting pattern of intermolecular interactions, as well as good stability in the dynamic complex, configuring a promising molecule.

Keywords: Chikungunya; CCR2; Virtual screening.



INTRODUÇÃO

A febre Chikungunya (CHIKF) é causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), pertencente à família *Togaviridae*, transmitido por meio da picada da fêmea infectada do mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (BRASIL, 2017). Sabe-se que o CHIKV é capaz de acometer células endoteliais e epiteliais humanas, fibroblastos, dendritos, macrófagos e células B, assim como células musculares, implicando na possibilidade de diferentes apresentações clínicas (OZDEN *et al.*, 2007).

Essa doença está associada a quadro clínico variável, caracterizado pela existência de duas fases: a aguda, de curta duração e de sintomas inespecíficos e associada aos sintomas clínicos que refletem a carga viral e o início da resposta da imunidade inata, estando relacionada com elevado nível de citocinas pró-inflamatórias (CHOW *et al.*, 2011) e a fase crônica, que por sua vez, é marcada pela presença de dores articulares persistentes, com comprometimento da qualidade de vida dos pacientes (CASTRO; LIMA; NASCIMENTO, 2016). Durante a fase crônica, ocorre um aumento na expressão da CCL2, uma quimiocina, e seu respectivo receptor, o receptor de quimiocina do tipo 2 (CCR2). A CCL2 medeia a quimiotaxia e induz à migração de células inflamatórias, o que contribui para o quadro inflamatório e desenvolvimento da fase crônica (SOUSA *et al.*, 2019).

Nessa perspectiva, sabendo-se da importância da doença, por ainda ser uma ameaça e por possuir mecanismos que necessitam de mais estudos, o emprego de métodos computacionais como estratégia para o planejamento e desenvolvimento de fármacos pode acelerar a descoberta de moléculas com potencial ação sobre o CCR2, contribuindo para descoberta de compostos com ação sobre a fase crônica da doença (MAVROMOUSTAKOS *et al.*, 2011). Desta forma, esse trabalho teve como objetivo central o emprego de métodos computacionais para triagem de substâncias de origem natural com potencial ação sobre o CCR2.

METODOLOGIA

Modelagem comparativa

A sequência da proteína foi obtida a partir do UNIPROT (CCR2 em humanos, código P41597). A

sequência primária da proteína alvo foi submetida ao BLASTP com as do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000), no qual foram selecionadas estruturas com identidade igual ou superior 25% e alta cobertura. Os moldes encontrados e a sequência alvo foram alinhados pelas ferramentas disponíveis no servidor SWISSMODEL (BIASINI *et al.*, 2014) pelo algoritmo CLUSTAL O. Os modelos gerados foram analisados pelo valor de DOPE score.

O modelo foi avaliado pelo servidor SWISS-MODEL, pelos parâmetros de desvio médio quadrático padrão (RMSD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996), gráfico de RAMACHANDRAM (LASKOWSKI *et al.*, 1993) e *software Atomic Non-Local Environment Assessment* (ANOLEA).

Modelos farmacofóricos

Um conjunto de 14 inibidores do CCR2 foram selecionados no ChEMBL (GAULTON *et al.*, 2017) através dos dados de atividade biológica (Ki) <1µm. Foram selecionados 6, aleatoriamente, para a construção dos modelos farmacofóricos no módulo GALAHAD™, implementado no programa SYBYL-X 2.0 (TRIPOS, 2011). Os modelos gerados foram avaliados quanto à pontuação de Pareto, energia, *sterics*, *hbond* e *mol_qry*.

Posteriormente, os modelos farmacofóricos (MF) foram avaliados pelo valor da curva ROC (AUC). Para essa última avaliação, foram utilizados os 8 inibidores restantes, juntamente com 400 *decoys* gerados a partir dessas moléculas no servidor DUD-E (MYSINGER *et al.*, 2012). A partir dos valores de QFIT foram construídas curvas ROC para cada modelo. Um bom método deve apresentar alta sensibilidade (valor=1, no eixo y) e especificidade (valor zero no eixo x) (SEIDEL *et al.*, 2010), desta forma, a AUC da curva ROC foi utilizada como métrica de avaliação, descartando-se MF com AUC < 0,7 e considerando-se o modelo com maior valor de AUC.

Triagem virtual hierárquica

O MF foi utilizado para triagem de 247.795 moléculas do banco de produtos naturais disponíveis no ZINC15 (STERLING; IRWIN, 2015). Foram



consideradas apenas moléculas com QFIT igual ou superior as de inibidores conhecidos.

As moléculas filtradas passaram para etapa de acoplamento molecular no programa FRED da *OpenEye Scientific*, avaliadas pela função de pontuação *ChemGauss4 Score* (MCGANN, 2011). A análise das interações intermoleculares com as moléculas foi realizada no mesmo programa. Para selecionar a melhor molécula, foi correlacionado o valor energia de afinidade com o QFIT, calculando a seguinte equação: $QFIT - (-\text{eficiência de ligação})$, onde a eficiência de ligação é igual a energia de afinidade dividido pelo número de átomos pesados.

Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas no pacote GROMACS (ABRAHAM *et al.*, 2015). O estado de protonação dos resíduos ácidos e básicos do receptor foi ajustado no módulo *pdb2gm*x implementado no programa GROMACS 5.1.2 de acordo com o pH ótimo (7,0) (ORTIZ-GÓMEZ *et al.*, 2006). Para isso, os valores de pKa dos resíduos foram avaliados no servidor web PDB2PQR (DOLINSKY *et al.*, 2004). Uma caixa dodecaédrica com modelo de água SPC-E (BERENDSEN; GRIGERA; STRAATSMA, 1987) foi utilizada para solvatar os sistemas da forma APO e do complexo.

A forma APO e o complexo foram minimizados inicialmente pelo algoritmo *Steepest Descent* (SD), em seguida, pelo algoritmo Gradiente Conjugado (GC) com 1000 ciclos cada. Após a minimização de energia do sistema, as simulações por DM foram realizadas durante uma simulação de 1ns no *ensemble* isotérmico-isobárico -

NPT (número de partículas, temperatura e pressão constante) ($t = 100$ ps), em seguida, nas mesmas condições, foi realizada uma simulação por dinâmica molecular de 100ns, sem restrição.

A estabilidade do sistema foi avaliada pela análise da variação do valor do desvio médio quadrático (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*) e da flutuação quadrática média (RMSF, do inglês *Root Mean Square Fluctuation*) através dos módulos *rms* e *rmsf*, respectivamente, disponíveis no GROMACS 5.1.2.

Análise de interações intermoleculares

A análise do padrão de interações intermoleculares após a DM foi verificada utilizando o servidor *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Modelagem comparativa

É encontrado o alvo CCR2 de *Homo sapiens* com código 5T1A depositado no banco PDB, porém com resolução de 2,8 Å. A preferência é para estruturas resolvidas de alta qualidade que possuam resolução menor, igual ou o mais próximo possível de 2,0 Å (SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021), visto que erros relacionados à localização ou a existência dos átomos podem estar diretamente ligados à resolução da estrutura, influenciando diretamente na qualidade (GONÇALVES, 2015), dessa forma sendo impossibilitado aplicar as técnicas virtuais nesse alvo, necessitando da modelagem comparativa para trazer resultados mais fidedignos. Os resultados encontram-se dispostos no quadro 1.

Quadro 1. Proteína alvo com os resultados dos moldes estruturais.

Proteína molde (PDB ID)	Identidade sequencial (%)	Cobertura do alinhamento (%)	Resolução (Å)
6GPS	86,08	99%	3,3
6GPX	83,43	78%	2,7
7F1S	74,37	83%	2,8
5T1A	99,55	81%	2,8
6MEO	79,31	76%	3,9
5UIW	64,93	77%	2,2

A acurácia da estrutura gerada por modelagem comparativa é diretamente proporcional ao grau de

identidade com a proteína-molde, quando o percentual de identidade é superior a 50%, o modelo gerado apresentará



Das sequências analisadas (quadro 1), a proteína com código PDB 5UIW foi selecionada para alinhamento com a sequência alvo e posterior construção do modelo, tendo em vista que houve alinhamento com mais de 50% de identidade com a estrutura alvo. Apesar de não ter sido a de maior identidade, foi selecionada para a próxima etapa de acordo com a melhor resolução, uma vez que é importante selecionar estruturas resolvidas de alta

qualidade para garantir melhor confiabilidade no resultado da construção (WATERHOUSE *et al.*, 2018).

A proteína utilizada como molde (5UIW) é a CCR5 receptor de quimiocina CC do tipo 5). Receptores CCR2 e CCR5 compartilham cerca de 85% de identidade de sequência em seus sítios ativos (JUNKER *et al.*, 2015), sendo que a figura 1 mostra marcações em azul do que se refere a cada respectivo sítio ativo, contendo 61% de aminoácidos idênticos, 11% aminoácidos similares, 15% com baixa similaridade entre os aminoácidos e 13% não há similaridade entre os aminoácidos, somando 87% de similaridade no sítio ativo, na média proposta em literatura.

[illegible]

As marcações em cor azul correspondem aos resíduos encontrados no sítio ativo do CCR2 para comparação com o molde. A marcação em verde corresponde aos aminoácidos que foram retirados no momento da modelagem.



Alguns estudos mostram que vários ligantes potentes do CCR5 também demonstram alta afinidade para o CCR2 e podem atuar como antagonistas duplos (JUNKER *et al.*, 2015), o que também demonstra como positivo o emprego desse molde para a geração do modelo 3D do CCR2. Outro estudo de alinhamento desses receptores mostrou que a maioria dos aminoácidos do CCR2 no sítio ortostérico são semelhantes ao do receptor CCR5 (KUMARI; SOBHIA, 2022). A parte que não há nenhuma similaridade entre os aminoácidos não há interferência no sítio ortostérico do CCR2, sendo assim indiferente na construção do modelo 3D desse alvo.

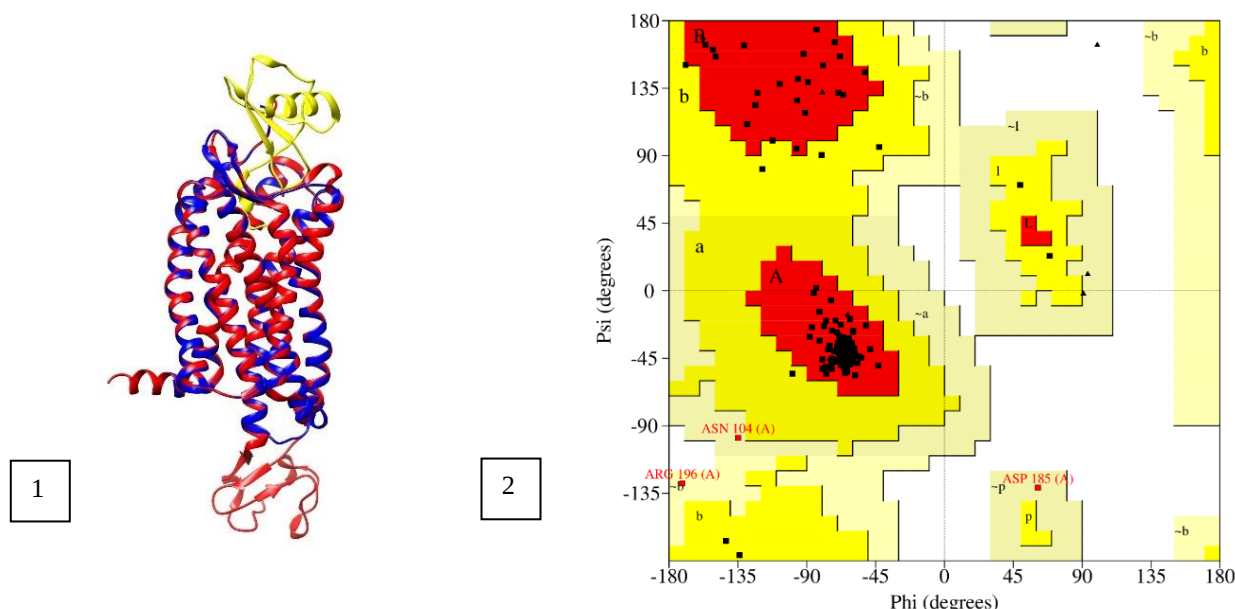
A predição da estrutura 3D gerou 5 modelos diferentes com valores de DOPE score (modelo 1 = 0,32; modelo 2 = 0,24; modelo 3 = 0,28; modelo 4 = 0,26; modelo 5 = 0,28). O modelo 2 foi selecionado por possuir melhor valor de DOPE score (ERAMIAN *et al.*, 2008).

O modelo 2 foi avaliado pelo servidor SWISS-MODEL (BIASINI *et al.*, 2014), inicialmente pelo

parâmetro de RMSD, que avalia a capacidade do modelo formado em se posicionar corretamente ao molde base (figura 2), resultando um valor de 0,25 Å. De acordo com a literatura, os valores de RMSD entre os próprios modelos experimentais provenientes de uma mesma proteína alcançam até 0,5 Å, o que corrobora a alta qualidade do modelo (CHOTHIA; LESK, 1986).

O gráfico de Ramachandran (figura 2) indicou ótima qualidade estérica, com 91,1% dos resíduos em regiões favoráveis e 7,7% em regiões permissivas, totalizando 98,8%. Apenas 3 resíduos estão em regiões generosamente permissivas (Asp185, Asn131 e Arg223), porém estão posicionados em *loop* na estrutura terciária. Nenhum resíduo foi encontrado em regiões não permitidas. Dessa forma, o modelo 2 obteve ótimos resultados, já que esse resultado indica pouquíssimos problemas nos ângulos torcionais da estrutura.

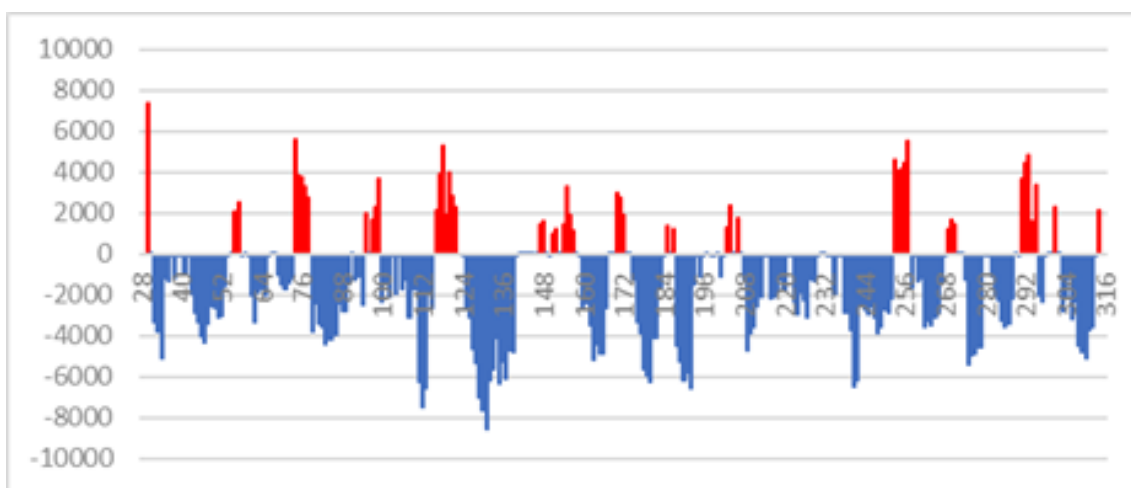
Figura 2. 1) RMSD: 0,25 Å. O modelo gerado (azul) sobreposto ao Molde PDB ID 5UIW (vermelho) com a proteína cristalográfica ligada ao sítio ativo (amarelo). 2) Representação do gráfico de Ramachandran.



Através da figura 3, pode ser observado que o modelo apresenta poucos resíduos com alta energia. São 2.317 átomos e 25.660 interações atômicas. A estrutura apresenta energia de -343 E/kT, com 83 aminoácidos de

alta energia, ou seja, as cadeias laterais desses resíduos estão se chocando, o que representa apenas 28,72% do total de 289 aminoácidos.

Figura 3. Gráfico de validação do modelo gerado. As regiões em vermelho representam valores altos de energia, enquanto que as regiões em azul representam regiões de baixa energia.



Modelo farmacofórico

Os modelos farmacofóricos gerados (n=10) foram avaliados através da análise de parâmetros internos do GALAHAD (quadro 2)

Quadro 2. Parâmetros estatísticos do GALAHAD™ para os modelos farmacofóricos construídos.

Modelo farmacofórico	Energia (Kcal/mol)	Pareto	Sterics	Hbond	Mol_qrY
1	27,82	0	5880,10	278,90	98,28
2	27,62	0	5732,60	290,20	94,83
3	28,01	0	5904,30	282,20	95,81
4	28,01	0	5904,30	282,20	95,81
5	27,62	0	5732,60	290,20	94,83
6	28,01	0	5904,30	282,20	95,81
7	27,58	0	5861,30	286,10	65,06
8	27,58	0	5861,30	286,10	65,06
9	27,62	0	5732,60	290,20	94,83
10	28,00	0	5857,40	290,20	80,71

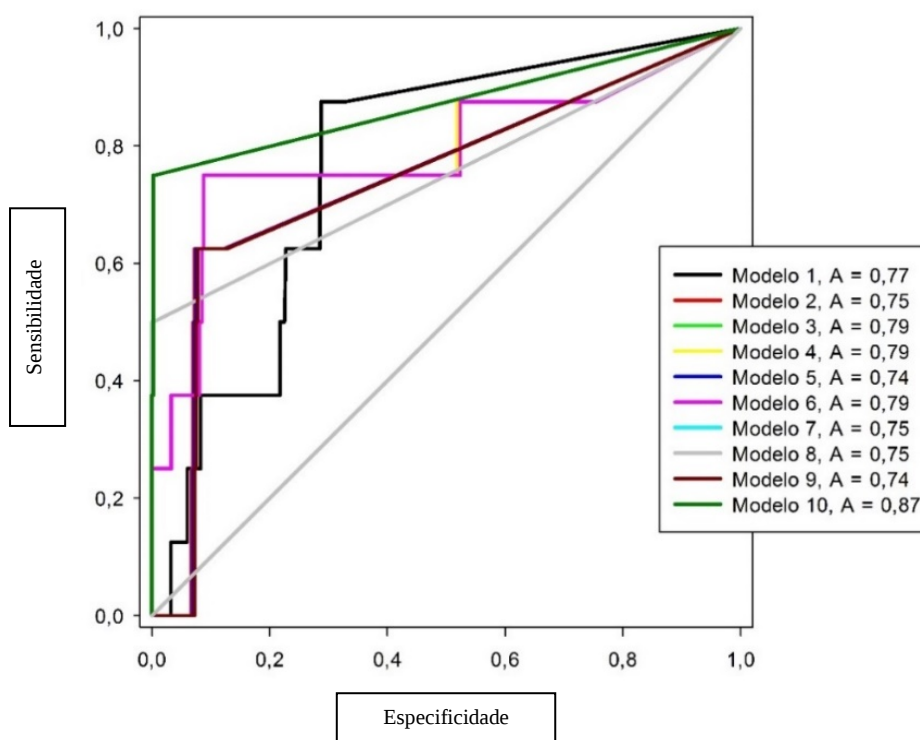
O valor de Pareto indica se um modelo é superior aos demais com base nos critérios de Sterics, Hbond e Mol_qry, devendo ser igual a 0 (CABALLERO, 2010). Portanto, demonstrou que os modelos remanescentes são estatisticamente equivalentes (ATHRI *et al.*, 2010), indicando que nenhum modelo é superior ao outro. Além disso, a utilização de conformações com valor de energia > 100,0 Kcal/mol reflete distorções nas moléculas para que os átomos se aproximem do centro dos pontos farmacofóricos (CABALLERO, 2010). Todos os

resultados dos modelos estão dentro abaixo de 100,0 Kcal/mol.

Dessa forma, o método da curva ROC foi adotado para avaliar a habilidade dos modelos farmacofóricos em diferenciar inibidores verdadeiros de falsos positivos (POLO; MIOT, 2020). Dentre os resultados, o modelo 10 obteve melhor valor de AUC de 0,87 (Figura 4), o que é considerado bom, dessa forma, o mais apropriado para a etapa de triagem virtual.



Figura 4. Curvas ROC obtidas para os modelos farmacofóricos de CCR2. A = AUC.

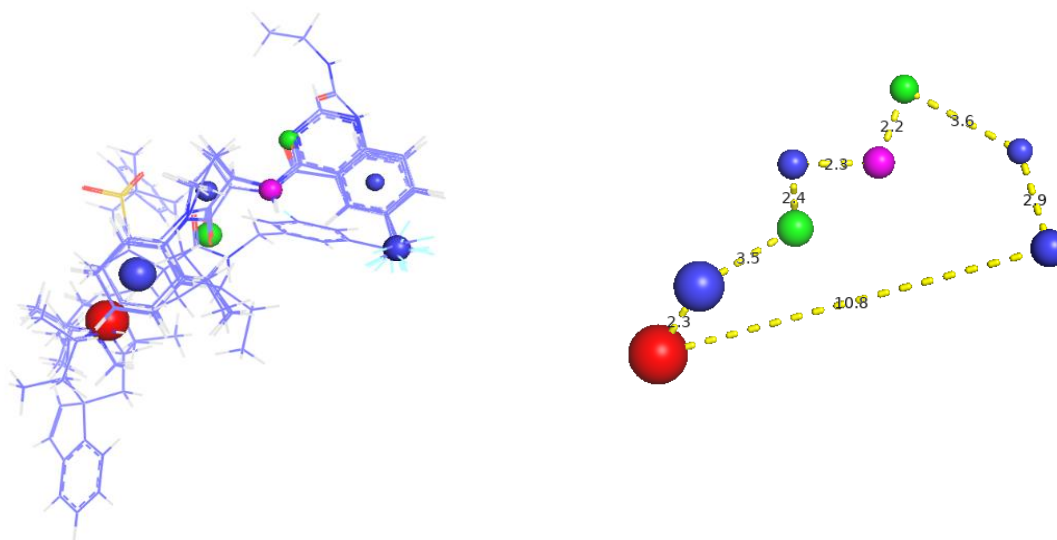


O modelo 10 (figura 5) apresentou oito características farmacofóricas, sendo um grupo doador de ligação de hidrogênio, dois grupos aceptadores de ligação de hidrogênio, quatro centros hidrofóbicos e um centro positivo. Com base na estrutura dos inibidores do CCR2, os principais farmacóforos estão relacionados a um padrão de átomo de nitrogênio que pode formar uma carga

positiva (centro positivo), presença de doador de ligação de hidrogênio e uma ligação de hidrogênio. O acceptor possui uma ligação amida e pelo menos um anel aromático, configurando centros hidrofóbicos (LIHUI *et al.*, 2015), o que corrobora com o padrão desenvolvido pelo modelo farmacofórico.



Figura 5. Representação do modelo farmacofórico 10 para CCR2. Doador de ligação de hidrogênio na cor rosa, aceitador de ligação de hidrogênio na cor verde, centro hidrofóbico na cor azul e centro positivo na cor vermelha.



Triagem virtual hierárquica

Das 247.795 moléculas do banco de produtos naturais, 448 moléculas se alinharam ao modelo 10, e dessas, apenas 181 obtiveram QFIT maior que a soma da média com 2 vezes o desvio padrão (Média + 2x desvio padrão) de todos os valores de QFIT gerados, as quais foram utilizadas para a etapa de acoplamento molecular.

O acoplamento molecular do alvo molde foi realizado com as 181 moléculas triadas pelo filtro de QFIT. Para a identificação da melhor molécula, foi levado em consideração a eficiência de ligação e o valor de QFIT

gerado no modelo farmacofórico. Para a eficiência de ligação foi utilizada a seguinte fórmula: $EL = \Delta G/N$ (Fonte: HOPKINS *et al*, 2014), onde EL = Eficiência de ligação, ΔG = Valor da função de pontuação e N = Número de átomos pesados. Para correlacionar com o valor de QFIT, foi calculado o score de consenso (EC) com a seguinte fórmula: $EC = (QFIT - (-EL))$, obtendo assim, um resultado favorável para os 2 parâmetros diferentes. No quadro 3, foi feito um recorte com base nos 5 melhores valores de EC, com isso, a ZINC000225476190 foi considerada a mais bem ranqueada.

Quadro 3. Relação entre energia de afinidade (acoplamento molecular), QFIT (modelo farmacofórico) e eficiência de ligação das moléculas pontuadas.

Molécula	ChemGauss4 Score	QFIT	Átomos pesados	Eficiência de ligação	EC
ZINC000085631220	-9,40	32,41	39	-0,24	32,65
ZINC000225476190	-7,75	41,90	33	-0,23	42,14
ZINC000085490790	-6,81	31,76	38	-0,17	31,94
ZINC000085595764	-5,96	35,27	45	-0,13	35,40
ZINC000012482927	-5,12	38,92	64	-0,08	39,00

Estudos de modelagem para o CCR2 postularam que os resíduos Tyr49, Trp98, Tyr120 e Glu291 formam uma rede estreita de interação intermolecular necessária para a ativação do receptor. Eles também concluíram que o Glu291 pode posicionar o ligante em diferentes orientações e gerar diferentes receptores conformações em conformidade. Essas conformações alternativas são estabilizadas pela ligação de antagonistas (HALL *et al.*, 2009). Kothandan, Gadhe e Cho (2012) também relataram que Tyr49, Trp98, Tyr120, His121 e Glu291 desempenham um papel crucial na ligação de antagonistas de CCR2. Outro estudo com o Cenicriviroc, aprovado clinicamente como um antagonista duplo dos CCR2 e CCR5, observou interação de ligação de hidrogênio com o resíduo Glu291 e o resíduo Trp98 está envolvido na interação de empilhamento π - π . Além disso é observada interações hidrofóbicas com os resíduos Trp98, Pro192, Val189, Leu 45, Tyr120, Ile263, Val289 e Phe194 (KUMARI; SOBHIA, 2022). Os resultados obtidos após o acoplamento molecular indicaram o mesmo padrão de interações intermoleculares entre ZINC000225476190 e o alvo molecular, uma vez que, foi observado ligações de hidrogênio com o Glu291 e interações hidrofóbicas com os resíduos: Trp98, Phe194, Pro192, Ile263. Essas

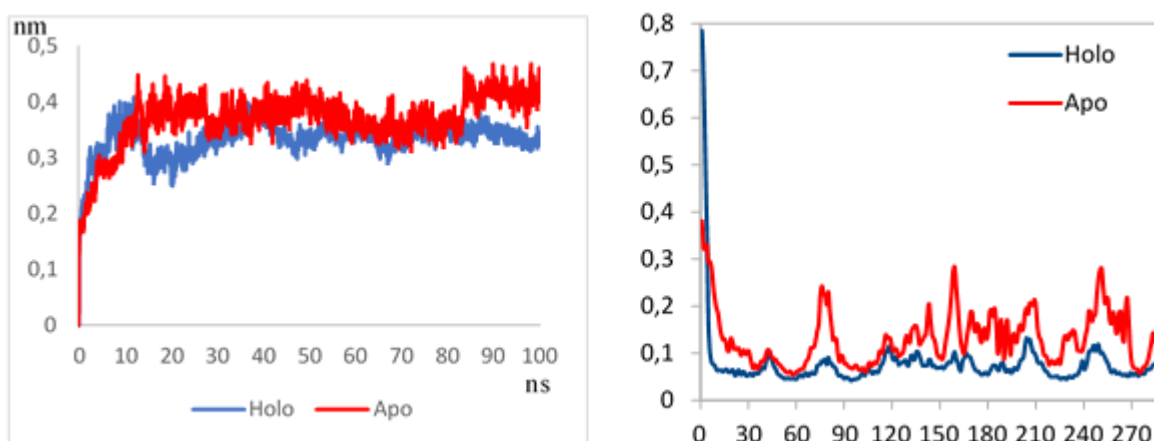
semelhanças sugerem que o composto identificado pode atuar fortalecendo sua viabilidade como um potencial candidato a fármaco contra a inflamação ocasionada pelo vírus da Chikungunya e ainda de diversas doenças inflamatórias (KOTHANDAN; GADHE; CHO, 2012).

Dinâmica molecular

O objetivo da DM, empregada após a triagem do banco de produtos naturais, foi avaliar a estabilidade do composto ZINC000225476190 no sítio ortostérico do modelo gerado de CCR2 em função do tempo, bem como o seu padrão de interações.

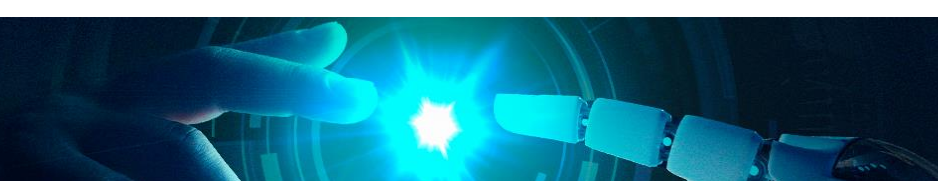
Inicialmente, os sistemas empregados nas simulações de DM foram avaliados quanto à equilíbrio estrutural, através do desvio médio quadrático (RMSD), o qual fornece informações de variação das posições atômicas comparadas com a estrutura de partida e ainda permite a identificação do momento em que o sistema atinge o equilíbrio (SARGSYAN; GRAUFFEL; LIM, 2017). O sistema APO e a forma HOLO foram avaliados quanto ao RMSD para a cadeia principal ao longo das trajetórias (Figura 6).

Figura 6. 1) RMSD (backbone) da estrutura APO (A) e do complexo (B) durante a dinâmica molecular. 2) RMSF (nm) (backbone) da forma APO e do complexo (HOLO) durante a fase produtiva da DM.



Os dados mostram que a forma APO apresenta equilíbrio entre 30ns a 80ns, já o complexo começa a equilibrar a partir de 65 ns e mantém até o final da simulação, ou seja, nesse tempo de simulação não há

variações conformacionais em uma magnitude maior que 0,1nm e, portanto, foi definida a fase produtiva, para a aquisição de dados. Esse resultado demonstra maior variação estrutural na forma APO do que quando



comparado com sua forma HOLO, ao longo da simulação, maior equilíbrio quando complexada ao ligante.

Também se observa, na figura 6, as flutuações atômicas dos resíduos individualmente através do cálculo de flutuação quadrática média (RMSF). As flutuações atômicas do complexo (azul) sugerem menor flutuação quando comparado com a forma APO (vermelho). Em destaque pode-se observar os locais dos resíduos do sítio ortostérico próximo a alguns pontos importantes de interação intermolecular, como Leu45, Tyr49, Trp98, Tyr120, His121, Val189, Pro192, Phe194, Ile263, Val289, Glu291 (KUMARI; SOBHIA, 2022), o que sugere que o complexo se manteve mais estável nos pontos do sítio ortostérico, principalmente próximo ao resíduo Cys250. Outras regiões com maiores flutuações da forma APO foram nos resíduos Asn77 e Ser159 que correspondem a regiões de alça, que tem como característica flexibilidade conformacional, e por isso, tendem a apresentar maiores valores de flutuação.

Os achados estão em consonância com estudos anteriores sobre a DM do CCR2. Hall *et al.* (2009) demonstraram que os resíduos Tyr49, Trp98, Tyr120 e Glu291 formam interações intermoleculares críticas para a ativação do CCR2, e que diferentes orientações do ligante podem induzir distintas conformações. Da mesma forma, Kothandan, Gadhe e Cho (2012) identificaram os resíduos Tyr49, Trp98, Tyr120, His121 e Glu291 como fundamentais na estabilização de antagonistas do CCR2. Além disso, estudos com o Cenicriviroc, já citado nesse estudo anteriormente, também evidenciaram a formação de ligações de hidrogênio com Glu291 e interações π - π com Trp98, além de interações hidrofóbicas com Pro192, Val189, Leu45, Tyr120, Ile263, Val289 e Phe194 (KUMARI; SOBHIA, 2022), reforçando a confiança no

estudo tanto a nível de acoplamento, quanto de dinâmica molecular. A semelhança no perfil de interação entre o Cenicriviroc e o ZINC000225476190 reforça a relevância do composto identificado neste estudo, sugerindo seu potencial como um novo candidato a inibidor do CCR2.

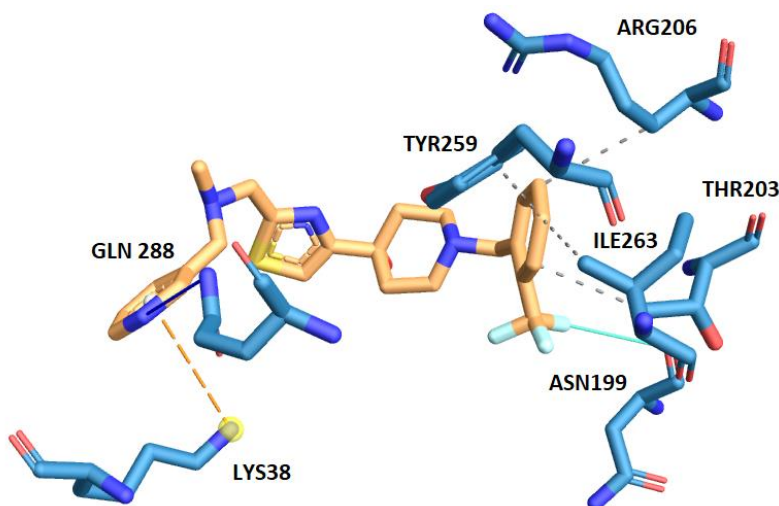
Em um contexto mais amplo, a sinalização via CCR2 tem sido associada a diversas doenças inflamatórias, incluindo a inflamação ocasionada pelo vírus da Chikungunya, em adição, a artrite reumatoide, aterosclerose, fibrose pulmonar e doença hepática crônica. A estabilização do receptor observada na presença do ZINC000225476190 pode ser um indicativo de sua eficácia na modulação dessas vias inflamatórias, o que justifica investigações futuras em modelos experimentais dessas doenças. Estudos prévios indicam que a redução da atividade do CCR2 está associada a diminuição da migração de monócitos e macrófagos para locais de inflamação, um mecanismo crucial para o tratamento de diversas doenças inflamatórias crônicas (SARGSYAN; GRAUFFEL; LIM, 2017).

Análise de interações intermoleculares

A figura 7 mostra o padrão de interação intermolecular entre os resíduos do sítio ortostérico ativo após a DM. Esses dados implicam que o ligante ZINC000225476190 mantém o padrão de interações hidrofóbicas com Thr203, Arg206 e Ile263 como observado nas interações intermoleculares na estrutura rígida através do acoplamento molecular, e ainda na estrutura flexível foi observada a mesma interação hidrofóbica com o resíduo Tyr259. A interação com o resíduo Ile263 foi observada em outros estudos de inibição frente ao CCR2 (KUMARI; SOBHIA, 2022).



Figura 7. Representação das interações entre o ligante promissor (laranja) e os resíduos de aminoácidos do alvo (azul) em um sistema flexível. Linha amarela: interação π -cátion; linha cinza: interação hidrofóbica; linha contínua azul: ligação de hidrogênio e linha contínua azul clara: ligação de halogênio.



A ligação de hidrogênio está relacionada com a única hidroxila do ligante com o resíduo Glu291, dada como importante (KUMARI; SOBHIA, 2022), porém na estrutura flexível a ligação de hidrogênio se deu através do nitrogênio da piridina do ligante com o resíduo Gln288. Também em literatura, o resíduo Trp98 está envolvido na interação de empilhamento π - π (KUMARI; SOBHIA, 2022), o que na estrutura rígida foi observada esse resíduo como interação de contato, porém após a DM foi possível observar apenas a interação π -cátion com um centro aromático do ligante com o resíduo Lys38 do receptor. Como novidade, foi observado uma interação de halogênio com o flúor do ligante e o resíduo Asn199, o que até então não foi proposto em literatura de forma direta.

CONCLUSÃO

A triagem virtual, aliada às simulações de dinâmica molecular, permitiu a identificação de um potencial inibidor do CCR2. As análises de acoplamento molecular destacaram interações do ZINC000225476190, incluindo interações de hidrogênio com Glu291 e contatos

com resíduos como Trp98, Phe194, Pro192 e Ile263. As simulações de DM indicaram que a presença do composto no sítio ativo contribui para a estabilização do sistema, reduzindo flutuações residuais e apresentando menores valores de RMSD na fase produtiva em comparação à forma Apo.

Os resultados obtidos sugerem que o ZINC000225476190 possui potencial para inibição do CCR2, fornecendo uma base sólida para estudos experimentais futuros, como ensaios *in vitro* e *in vivo*, para validar sua eficácia e segurança. Além disso, investigações teóricas adicionais, como estudos de mecânica quântica (QM), podem aprimorar a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos, oferecendo novos *insights* para o desenho racional de fármacos e contribuindo para o desenvolvimento de inibidores mais seletivos e eficazes.

AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos à *OpenEye Scientific* pela concessão de acesso à sua plataforma de software e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo financiamento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M.J. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multilevel parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015.
- ATHRI, P.; WENZLER, T.; TIDWELL, R.; BAKUNOVA, S.M.; WILSON, W.D. Pharmacophore model for pentamidine analogs active against *Plasmodium falciparum*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 6147–6151, 2010.
- BERENDSEN, H.J.C.; GRIGERA, J.R.; STRAATSMA, T.P. The missing term in effective pair potentials. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 91, p. 6269–6271, 1987.
- BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BIASINI, M. *et al.* SWISS-MODEL: Modelling Protein Tertiary and Quaternary Structure Using Evolutionary Information. **Nucleic Acids Research**, 42, 252-258. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Chikungunya: manejo clínico** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- CABALLERO, J. 3D-QSAR (CoMFA and CoMSIA) and pharmacophore (GALAHAD) studies on the differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 3, p. 363–371, 2010.
- CASTRO, A. P. C. R.; LIMA, R. A.; NASCIMENTO, J. S.. Chikungunya: vision of the pain clinician. **Revista Dor**, v. 17, n. 4, p.299-302, 2016.
- CHOTIA C. *et al.* The predicted structure of immunoglobulin D1.3 and its comparison with the crystal structure. **Science**, 233(4765), p. 755-758, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.3090684>.
- CHOW, A. *et al.* Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **J Infect Dis**. 2011.
- DOLINSKY, T.J.; NIELSEN, J.E.; MCCAMMON, J.A.; BAKER, N.A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. W665-W667, 2004.
- ERAMIAN, D. A composite score for predicting errors in protein structure models. p. 1653–1666. 2006.
- FRENKEL, Z. M.; TRIFONOV, E. N. Evolutionary Networks in the Formatted Protein Sequence Space. **Journal Of Computational Biology**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 1044-1057, 2007.
- GAULTON, A. *et al.* The ChEMBL database in 2017. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 45, n. 1, p. 945-954, 2017.
- GONÇALVES, W. R. S. **PDBEST- uma ferramenta de processamento paralelo para aquisição, manipulação, edição e filtragem de arquivos do Protein Data Bank (PDB)**. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioinformática, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- HALL, S. E. *et al.* Elucidation of binding sites of dual antagonists in the human chemokine receptors CCR2 and CCR5. **Molecular Pharmacology**, 75(6), 1325-1336. 2009.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD - Visual Molecular Dynamics, **J. Molec. Graphics**, v. 14, p. 33-38, 1996.
- JUNKER, A. *et al.* Synthesis, binding affinity and structure–activity relationships of novel, selective and dual targeting CCR2 and CCR5 receptor antagonists. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 2407-2422, 2015.



KOPP, J.; SCHWEDE, T. **Automated protein structure homology modeling: a progress report.** *Pharmacogenomics*, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 405-416, 2004.

KOTHANDAN, G; GADHE, C. G.; CHO, S.J. Structural Insights from Binding Poses of CCR2 and CCR5 with Clinically Important Antagonists: A Combined In Silico Study. *PLoS ONE*, 7 (3), 2012.

KUMARI, S.; SOBHIA, E. Computer-aided molecular design of CCR2 – CCR5 dual antagonists for the treatment of NASH. *Journal of Bioinformatics and Systems Biology*, p. 63-77. 2022.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26, p. 283-291, 1993.

LIHUI, Q. *et al.* Pharmacophore Model-based Design and Synthesis of New Structure Small Molecule CCR2 Inhibitors[J]. *Acta Chim. Sinica*, v. 73, n. 7, p. 679-684, 2015.

MAVROMOUSTAKOS, T. *et al.* Strategies in the Rational Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 2011, n.18, p. 2517-2530, 2011.

MCGANN, M. FRED Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. *Journal Of Chemical Information And Modeling*, [S.L.], v. 51, n. 3, p. 578-596, 16 fev. 2011.

MYSINGER, M.M.; CARCHIA, M.; IRWIN, J.J., SHOICHET, B.K. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, p. 6582-6594, 2012.

ORTIZ-GÓMEZ, A. *et al.* Farnesyl Diphosphate Synthase Is a Cytosolic Enzyme in *Leishmania major* Promastigotes and Its Overexpression Confers Resistance to Risedronate. *Eukaryotic cell*, v. 5, n. 7, p. 1057–1064, 2006.

OZDEN, S. *et al.* Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *PLoS One*. 2007.

POLO, T. C. F.; MIOT, H. A. Aplicações da curva ROC em estudos clínicos e experimentais. *Jornal Vascular Brasileiro*, [S.L.], v. 19, p. 1-4, 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1677-5449.200186>.

SARGSYAN, K.; GRAUFFEL, C.; LIM, C. How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 13, n. 4, p. 1518-1524, 2017.

SILVA, L. X. BASTOS, L. L. SANTOS, L. H. **Modelagem computacional de proteínas.** In: BIOINFO – Revista brasileira de bioinformática e biologia computacional. 1ed. vol. 1. Lagoa Santa: Editora Alfahelix, 2021.

SEIDEL, T. *et al.* Strategies for 3D pharmacophore-based virtual screening. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 7, n. 4, 2010.

SOUSA, C. D. F. *et al.* **Papel dos receptores de quimiocina CCR2 e CCR5 na patogênese da infecção pelo vírus Chikungunya.** 2019. 82 f. Tese (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2019.

STERLING, T.; IRWIN, J.J. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 55, n. 11, p. 2324–2337, 2015.

TRIPOS. **GALAHAD™ Manual.** SYBYL 2.0, p. 1-90, St Louis, MO, USA, 2011.

WATERHOUSE, A. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. 1, p. 296-303, 2018.

