EFEITO PROTETOR DA ENZIMA BROMELINA NA FIBROMIALGIA: UMA ANÁLISE DOS MECANISMOS DE AÇÃO SOBRE O SISTEMA CATECOLAMINÉRGICO - FASE II

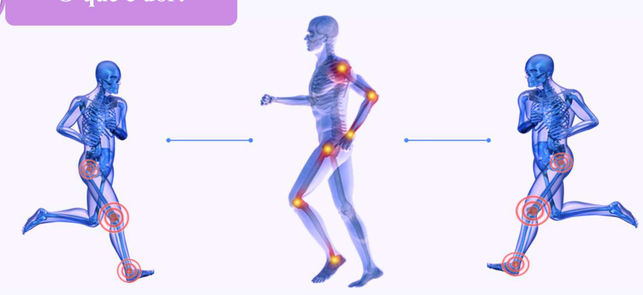
Autora
Naiara Pereira Martins

Orientadores
Me. Carlos Pereira Martins e Dr. Maurício Peña Cunha

PROBLEMÁTICA

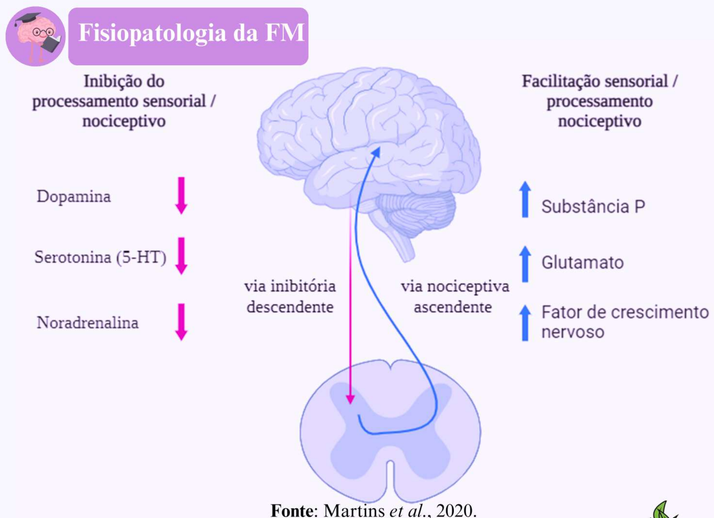
A Fibromialgia (FM) é uma síndrome de dor musculoesquelética crônica que está frequentemente associada a comorbidades, como fadiga, depressão, ansiedade, distúrbios do sono, alterações do humor, dores nas articulações e síndrome do intestino irritável. A prevalência da FM é de 2 a 8% da população global (BANFI *et al.*, 2021).

O que é dor?



Fonte: Biorender (2024).

Fisiopatologia da FM



Fonte: Martins *et al.*, 2020.

Ferramentas para *análise in sílico*

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

A FM afeta a qualidade de vida dos pacientes. O estudo sugere que a bromelina pode aliviar a dor crônica e melhorar os distúrbios de humor ao regular receptores dopaminérgicos e reduzir a hipersensibilização no sistema nervoso central e periférico.

OBJETIVOS

Investigar os efeitos protetores da enzima bromelina como potencial terapêutico em modelos de Fibromialgia, identificando os alvos moleculares envolvidos em seus mecanismos de ação.

- Analisar os bioativos da bromelina por meio de análise fitoquímica.
- Cultivar células com receptores dopaminérgicos para avaliar a captação de dopamina após exposição à bromelina.
- Investigar a expressão dopaminérgica em células tratadas com 6-OHDA.
- Realizar *docking* molecular entre bromelina e as proteínas BDNF e RAGE.
- Avaliar interação molecular entre a FM e a enzima bromelina.
- Avaliar a toxicidade *in silico* da enzima bromelina.

METODOLOGIA

Análises Fitoquímica

O propósito da análise fitoquímica foi identificar a presença de grupos metabólicos secundários na enzima bromelina, obtida a partir da *Anana comosus.*

Fenóis — Flavonoides — Saponinas

Fonte: O arquivo do projeto (2024).

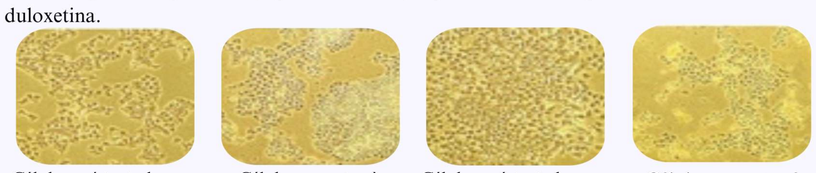
Análise antioxidante

A atividade antioxidante da bromelina foi analisada pelo ensaio DPPH, onde a redução da absorbância foi avaliada em espectrofotômetro, indicando a capacidade antioxidante em comparação ao controle.

Fonte: O arquivo do projeto (2024).

Cultura de células

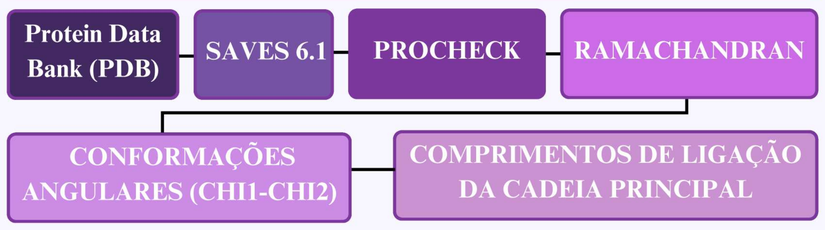
A cultura de células foi realizada utilizando a linhagem SH-SY5Y, derivada de neuroblastoma, mimetizando um modelo *in vitro* de FM. As células foram expostas à substância 6-hidroxidopamina (6-OHDA) por 24 horas, após tratamento prévio com bromelina e duloxetina.



Células pré-tratadas com duloxetina — Células expostas à 6-OHDA — Células pré-tratadas com bromelina — Células expostas à 6-OHDA

Fonte: O arquivo do projeto (2024).

Análise estrutural da enzima bromelina



A estrutura tridimensional da bromelina foi obtida da *Protein Data Bank (PDB)* e analisada com o software SAVES 6.1. A avaliação estrutural incluiu a análise dos ângulos diedros φ e ψ por meio do gráfico de *Ramachandran*, destacando conformações favoráveis e desfavoráveis. Gráficos *Chi1-Chi2* foram utilizados para analisar os ângulos de torsão das cadeias laterais, comparando com padrões conhecidos. A análise dos comprimentos de ligação da cadeia principal também foi realizada para garantir a estabilidade e funcionalidade da proteína.

Análise de Alvos Biológicos e Interação Molecular

Busca em bases de dados → Identificação dos alvos da bromelina → Interação dos alvos → STRING

Fluxo metodológico da identificação de alvos moleculares comuns entre a bromelina e a FM. Foram consultadas bases de dados (*GeneCards, DisGeNET, Open Targets*) para identificar genes/proteínas associadas à FM, enquanto os alvos da bromelina foram obtidos por meio do (*SwissTargetPrediction*) revisão da literatura e bancos de dados de fármacos (*Pharmacompass*). A interseção entre os conjuntos foi realizada utilizando a ferramenta de bioinformática (*Venny 2.1*).

Docking molecular

A bromelina e as proteínas BDNF e RAGE foram retiradas do PDB

↓

Foi realizado uma simulação de interação proteína-proteína no software ClusPro

↓

Análise dos resultados das interações entre a bromelina e as proteínas BDNF e RAGE

Interações proteína-proteína entre bromelina e BDNF, e entre bromelina e RAGE, avaliadas por docking molecular na plataforma ClusPro 2.0. As estruturas tridimensionais das proteínas foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) e submetidas à análise baseada no algoritmo de *Fast Fourier Transform* (FFT), considerando forças repulsivas, atrativas, eletrostáticas e termo de afinidade. As interações foram visualizadas no LigPlot+ e comparadas com gráficos gerados pelo EMBL-EBI PDBsum.

Toxicidade In Silico - biodisponibilidade de Lipinski

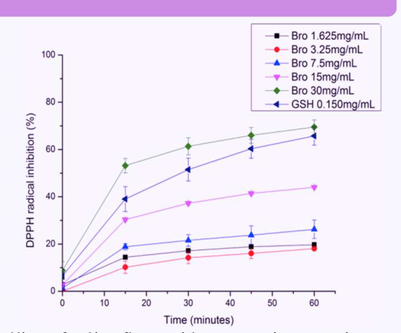
ProTox-II → Toxicidade aguda → Toxicidade em órgãos-alvo → Parâmetros toxicológicos

A ProTox-II emprega técnicas avançadas, como similaridade molecular, análise de fragmentos estruturais e aprendizado de máquina, além de um conjunto de 33 modelos preditivos. Esses modelos permitem prever diversos desfechos toxicológicos, incluindo toxicidade aguda, hepatotoxicidade, citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, imunotoxicidade, neurotoxigenicidade, vias de resultados adversos (Tox21) e alvos de toxicidade.

RESULTADOS

Metabólitos secundários e atividade antioxidante

Grupos metabólitos	Positivo
Fenóis	+
Flavonóides	+
Saponinas	+
Taninos	+
Polissacarideos	+



(A) A tabela indica a presença positiva dos metabólitos fenóis, flavonoides, saponinas, taninos e polissacarídeos, sugerindo o potencial bioativo das amostras. (B) O gráfico mostra que a bromelina, em diferentes concentrações (1,625 mg/mL a 30 mg/mL), e a glutationa (0,150 mg/mL) inibem o radical DPPH, sendo a atividade antioxidante da bromelina dose-dependente. **Fonte**: O arquivo do projeto (2024) e Ataíde *et al.* (2017).

Teste de absorbância e Teor de dopamina em células SH-SY5Y

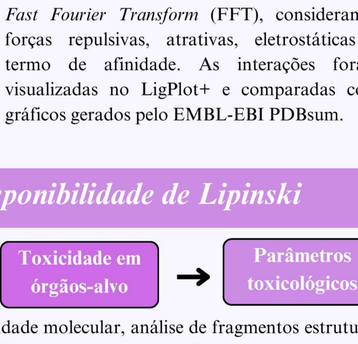
A-branco — A-branco _____ 100%

A-mostra — A-amostra _____ x

$$x = \frac{A - amostra \times 100}{A - branco}$$

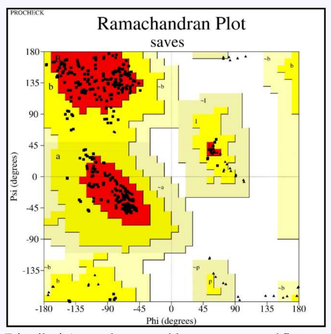
$$x = \frac{0{,}520 \times 100}{0{,}600}$$

$$x = 86\%$$

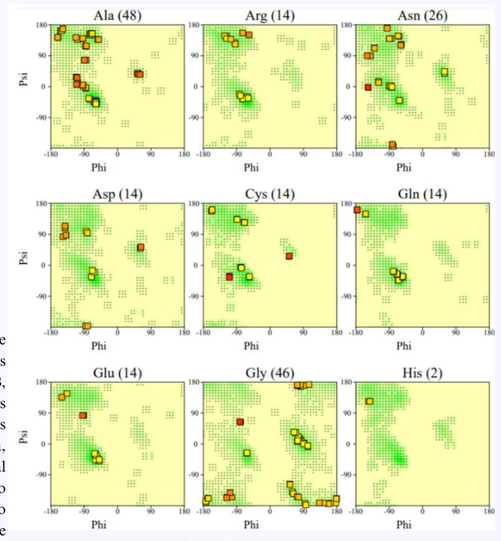


As porcentagens da atividade antioxidante foram calculadas para cada concentração com base nas absorbâncias. O pré-tratamento com bromelina por 24 horas, nas concentrações de 0,625 µg/ml e 30 µg/ml, aumentou significativamente a expressão celular de dopamina em comparação com o grupo 6-OHDA ($p < 0{,}001$). Além disso, a duloxetina na concentração de 30 µg/ml também causou um aumento significativo na proporção de dopamina em relação ao grupo 6-OHDA ($p < 0{,}05$). **Fonte**: O arquivo do projeto (2024).

Análise Estrutural da Enzima Bromelina

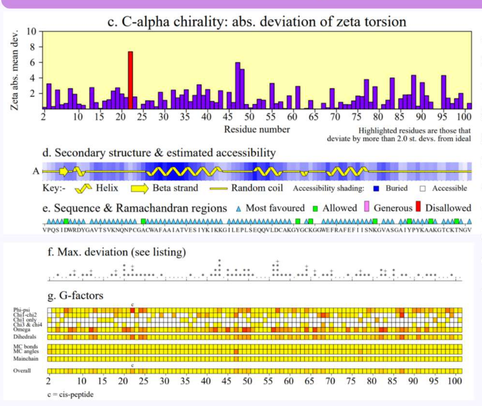


Distribuição dos resíduos no gráfico de Ramachandran, mostrando que 86,2% (312) dos resíduos estão nas regiões mais favorecidas (A, B, L), enquanto 13,8% (50) estão nas regiões adicionais permitidas (a, b, l, p). Não foram observados resíduos nas regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p) e nas regiões não permitidas. Um total de 430 resíduos foi analisado, com 362 não glicosilados e não polínicos, indicando conformidade com os padrões de qualidade esperados em modelos estruturais.



Fonte: Arquivo do projeto (2024).

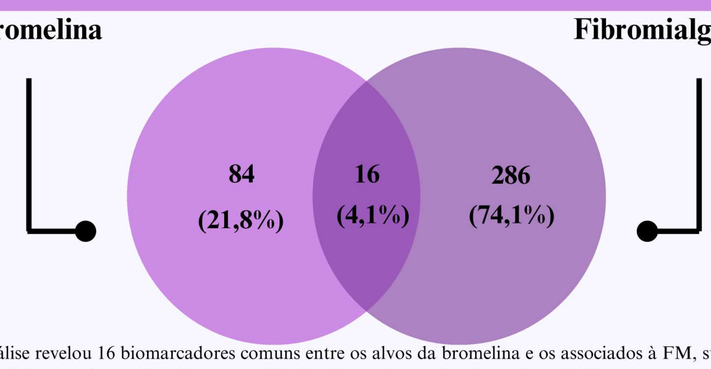
Propriedades residuais



A figura mostra a estrutura do carbono alfa (Cα) em um aminoácido, evidenciando sua qualidade. Cada Cα é ligado a quatro grupos diferentes: um grupo amino, um grupo carboxila, um hidrogênio e uma cadeia lateral (R). A configuração quiral (L ou D) do Cα influencia a conformação da proteína e suas interações moleculares, desempenhando um papel crucial na estrutura e função das biomoléculas. **Fonte:** Arquivo do projeto (2024).

Os gráficos de Ramachandran mostram as preferências conformacionais dos resíduos, identificando regiões permitidas e não permitidas, essenciais para avaliar a estabilidade e funcionalidade da proteína.

Interação de Alvos Moleculares: Bromelina e FM



A análise revelou 16 biomarcadores comuns entre os alvos da bromelina e os associados à FM, sugerindo potenciais mecanismos de ação compartilhados. **Fonte**: O arquivo do projeto (2025).

Rede de processos biológicos e Ontologia Gênica

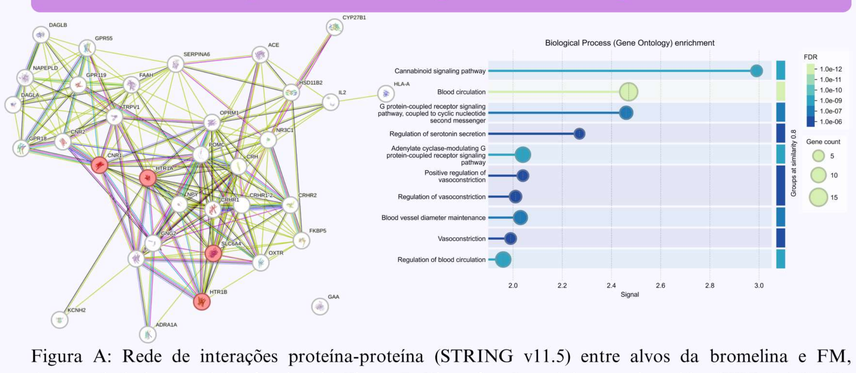
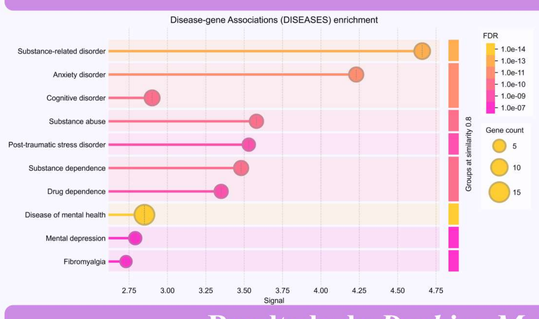


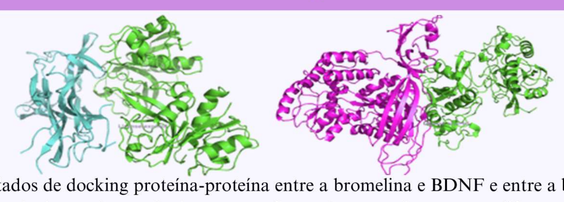
Figura A: Rede de interações proteína-proteína (STRING v11.5) entre alvos da bromelina e FM, destacando hubs e módulos funcionais. Figura B: Vias e funções celulares enriquecidas (FDR < 1,0e-12), com destaque para resposta imune, sinalização celular e metabolismo energético. **Fonte**: Arquivo do projeto (2025).

Enriquecimento de Associações entre Doenças e Genes



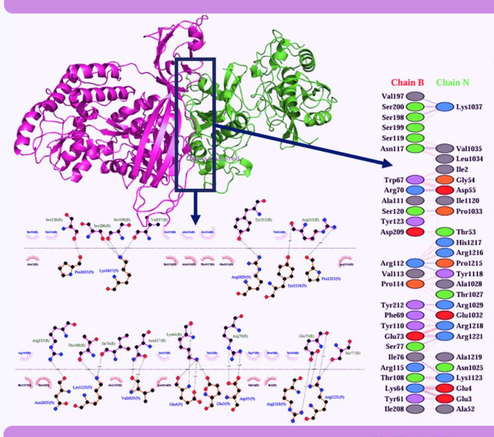
Enriquecimento de associações entre doenças e genes (DISEASES). O gráfico exibe a relação entre diferentes doenças e a expressão gênica associada, evidenciando conexões relevantes para distúrbios como fibromialgia, depressão mental, transtornos de ansiedade e dependência química. **Fonte:** O arquivo do projeto (2025).

Resultado do *Docking Molecular*



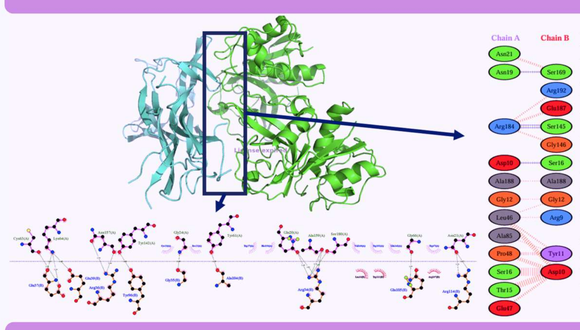
A análise dos resultados de docking proteína-proteína entre a bromelina e BDNF e entre a bromelina e a proteína RAGE revela interações estáveis e as conformações promissoras em diferentes clusters de energia. Interações macromoleculares entre Bromelina (verde) e BDNF (ciano); Bromelina (verde) e RAGE (rosa). **Fonte:** O arquivo do projeto (2024).

RAGE



A docagem macromolecular entre RAGE e Bromelina revelou diversas interações, sugerindo um complexo estável. Foram identificados aminoácidos importantes na Cadeia B (RAGE) e na Cadeia N (Bromelina), com destaque para os resíduos Val107, Ser109, Thr117 e Asp120 na Cadeia B do RAGE, que são fundamentais para a ligação com a Bromelina. O aminoácido Asp120, em particular, pode formar interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio com resíduos básicos ou neutros da Bromelina, sendo essencial para a interface de ligação. **Fonte**: O arquivo do projeto (2024).

BDNF



Representação gráfica da interação molecular entre BDNF (Cadeia A) e Bromelina (Cadeia B). A estrutura tridimensional mostra os pontos de interação chave entre as proteínas, com destaque para os resíduos envolvidos na interface de ligação. **Fonte**: O arquivo do projeto (2024).

Toxicidade da enzima Bromelina no servidor ProTox II

Tipo de toxicidade	Predição	Probabilidade (%)
Hepatotoxicidade	Inativo	0,80
Neurotoxicidade	Inativo	0,54
Carcinogenicidade	Inativo	0,79
Mutagenicidade	Inativo	0,81
Citotoxicidade	Inativo	0,68
Barreira hematoencefálica	Inativo	0,94

Predição da toxicidade da bromelina via ProTox-II. A tabela mostra tipos de toxicidade, predição (ativo/inativo) e probabilidade associada. Valores altos indicam maior confiança na inatividade. **Fonte**: Os autores (2025).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados deste estudo evidenciam o potencial terapêutico da bromelina, destacando seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, imunomoduladores e neuroprotetores, especialmente na proteção de células dopaminérgicas. A modelagem molecular e a análise de *docking* reforçam sua interação com alvos envolvidos na modulação da dor e inflamação. Além disso, a predição de toxicidade sugere um perfil seguro para uso. No entanto, estudos adicionais são necessários para validar esses efeitos *in vivo* e explorar sua aplicação clínica. A combinação da bromelina com terapias convencionais pode representar uma estratégia promissora para o tratamento da FM e condições associadas.

REFERÊNCIAS

ATAIDE, Janaína Artem *et al.* Bacterial Nanocellulose Loaded with Bromelain: assessment of antimicrobial, antioxidant and physical-chemical properties. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 100-110, 21 dez. 2017.

ARAÚJO, Fábio Fernandes de *et al.* Polyphenols and their applications: an approach in food chemistry and innovation potential. **Food Chemistry**, v. 338, n. 14, p. 127535-127535, fev. 2021.

CUNHA, Mauricio Peña. **Efeito Antidepressivo e Neuroprotetor da Creatina**. 2013. 150 f. Tese (Doutorado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MARTINS, C. P *et al.* Pramipexole, a dopamine D3/D2 receptor-preferring agonist, attenuates reserpine-induced fibromyalgia-like model in mice. **Neural Regeneration Research**, v. 17, n. 2, p. 450, 2022.